

**Funktion von CbfA in der epigenetischen Kontrolle
des TRE5-A-Retrotransposons aus
*Dictyostelium discoideum***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Heike Dölz
geboren am 06.07.1980

Jena, im Dezember 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Winckler (FSU Jena)
2. Prof. Dr. Hans Peter Saluz (HKI Jena)
3. Prof. Dr. Wolfgang Nellen (Universität Kassel)

Tag der Disputation: 04.04.2011

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>i</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>iv</i>
<i>Abkürzungen</i>	<i>vii</i>
1 Einleitung	1
1.1 Epigenetische Genregulation	1
1.2 Die JumonjiC-Domäne (JmjC)	2
1.3 <i>Dictyostelium discoideum</i> – Modellorganismus der sozialen Amöben	5
1.4 Die phylogenetische Stellung von <i>D. discoideum</i> im System der Eukaryoten	6
1.5 Der Lebenszyklus von <i>Dictyostelium discoideum</i>	7
1.6 Regulation der frühen multizellulären Entwicklung	9
1.7 Organisation des Genoms	11
1.8 Transposable Elemente im Genom von <i>D. discoideum</i>	12
1.8.1 DNA-Transposons	13
1.8.2 Retrotransposons	14
1.9 Struktureller Aufbau des C-Modul-bindenden Faktors A (CbfA)	18
1.10 Vorangegangene Arbeiten zur Funktion von CbfA	20
1.11 Weitere JmjC-Proteine aus <i>Dictyostelium discoideum</i>	23
1.12 Zielstellung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Laborgeräte, Chemikalien und deren Bezugsquellen	26
2.1.2 Allgemeine Lösungen und Puffer	28
2.1.3 Nährmedien, Antibiotika und Additive	29
2.1.4 Oligonukleotide, Plasmide und Vektoren	30
2.1.5 Kits und Enzyme	30
2.1.6 Antikörper	31
2.1.7 Mikroorganismen	32
2.2 Molekularbiologische Standardmethoden	34
2.2.1 Zielgerichtete <i>in vitro</i> -Mutagenese	34

Inhaltsverzeichnis

2.2.2	Extraktion von RNA und Synthese von cDNA	36
2.2.3	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (qRT-PCR)	36
2.2.4	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System	37
2.3	Biochemische Standardmethoden	40
2.3.1	Heterologe Expression rekombinanter Proteine im analyt. Maßstab	40
2.3.2	Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Proteine im analyt. Maßstab	42
2.3.3	Heterologe Expression und denaturierende Aufreinigung rekombinanter Proteine im präparativen Maßstab	42
2.3.4	Rückfaltung der denaturierten und aufgereinigten JmjC-Domäne	43
2.3.5	<i>In vitro</i> Transkription und Translation von Proteinen	44
2.3.6	Radioaktive <i>in vitro</i> Coimmunopräzipitation	45
2.3.7	Nicht radioaktiver <i>Pull-down-Assay</i>	45
2.3.8	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	46
2.3.9	Immunofluoreszenz	49
2.4	Zellbiologische und molekularbiologische Methoden für <i>Dictyostelium discoideum</i>	50
2.4.1	Allgemeine Kulturbedingungen für verschiedene <i>D. discoideum</i> -Stämme	50
2.4.2	Präparation von Zelllysaten	50
2.4.3	Herstellung von Kernextrakten	51
2.4.4	Peptid- <i>Pull-down-Assay</i>	52
2.4.5	Wachstums- und Entwicklungs-Phänotypisierung von Mutanten	52
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Übersicht zum Stand der Forschung in der funktionellen Charakterisierung von CbfA	54
3.2	Die epigenetische Genregulation verschiedener Retrotransposons durch CbfA	55
3.3	Die CbfA-vermittelte Genregulation – Eine Untersuchung mittels Chromatin-Immunopräzipitationen	61
3.4	<i>In vivo</i>-Nachweis der Bindung des <i>acaA</i>-Promotors durch CbfA	66
3.5	Konstruktion und Charakterisierung von CbfA-Deletions-mutanten.....	69
3.6	Die JumonjiC-Domäne von CbfA: eine funktionelle Beschreibung.....	74
3.6.1	Untersuchungen des Methylierungsstatus am Lysin 4 und 9 des Histons H3 mittels Immunofluoreszenz	74
3.6.2	CbfA erkennt die Trimethylierung von Lysin 9 im Histon H3	76
3.6.3	Chromatin-Immunopräzipitationen anhand spezifischer Histon-methylierungen	77
3.6.4	Heterologe Expression der JmjC-Domäne in bakteriellen Expressionssystemen	80
3.6.5	Rückfaltungsversuche des aufgereinigten Proteins CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆	89

3.6.6	Suche nach Interaktionspartnern der JmjC-Domäne von CbfA.....	95
3.6.7	Nähere Untersuchungen des Interaktionspartners Aktin im Hefe-Zwei-Hybrid-System .	99
3.6.8	<i>In vitro</i> Co-Immunopräzipitationen möglicher Interaktionspartner.....	103
3.6.9	<i>Pull-down-Assay</i> von CbfA durch das Set1-Derivat	104
4	<i>Diskussion</i>	107
4.1	Genregulatorische Funktion von CbfA.....	107
4.2	Der Verlust einer funktionellen Domäne von CbfA führt zu einem Entwicklungsdefekt.....	109
4.3	Erste Erkenntnisse zur Funktion der JumonjiC-Domäne von CbfA	111
4.4	Herstellung der CbfA-JumonjiC-Domäne für Strukturanalysen	114
4.5	Suche nach Interaktionspartnern der JumonjiC-Domäne	115
4.6	CbfA beeinflusst die Expression mehrerer Retrotransposons.....	117
4.7	RNA-Interferenz und Methylierung beeinflussen die Aktivität von Retrotransposons	121
4.8	Ausblick	126
5	<i>Zusammenfassung</i>	127
6	<i>Summary</i>	129
7	<i>Literaturverzeichnis</i>	131
	<i>Anhang</i>	<i>142</i>
	<i>Liste der wissenschaftlichen Publikationen</i>	<i>148</i>
	<i>Danksagung</i>	<i>149</i>
	<i>Lebenslauf</i>	<i>150</i>
	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	<i>151</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus der DNA-Reparatur durch AlkB für 1-Methyladenosin (1-meA) und 3-Methylcytosin (3-meC).....	3
Abbildung 2: Demethylierungsreaktion eines Lysinrestes über eine Hydroxylierung unter Verwendung von Fe ²⁺ und 2-OG durch ein JmjC-Domäne enthaltende Demethylase.....	5
Abbildung 3: Proteombasierende Phylogenie der Eukaryoten.....	7
Abbildung 4: Die multizelluläre Entwicklungsphase von <i>D. discoideum</i>	8
Abbildung 5: Regulatorisches Netzwerk während der frühen Entwicklungsphase von <i>D. discoideum</i>	9
Abbildung 6: Überblick der in <i>D. discoideum</i> vorhandenen Transposons	13
Abbildung 7: tRNA-Gen-assoziierte Integration der Non-LTR-Retrotransposons von <i>D. discoideum</i>	15
Abbildung 8: Struktur von TRE5-A.1.....	15
Abbildung 9: Darstellung der Domänenstruktur und der Aminosäuresequenz des Transkriptionsregulators CbfA.....	18
Abbildung 10: Northern-Blot-Analysen zur Untersuchung der TRE5-A-Transkriptionsstärke in Abhängigkeit zur Expression des Volllängenproteins von CbfA und des Derivates CbfA ⁷²⁴⁻⁹⁹⁸	22
Abbildung 11: Northern-Blot-Analyse der Expression entwicklungsrelevanter Gene im Vergleich von AX2 und JH.D	24
Abbildung 13: Strukturen verschiedener Retrotransposons.	56
Abbildung 14: PCR-Produkte der in der qRT-PCR analysierten Retrotransposon-sequenzen	57
Abbildung 15: Regulatorischer Einfluss von Wildtyp-CbfA (AX2), des CbfA ²⁻⁹⁹⁸ -Derivats (rCbfA) und des GFP-CbfA ⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ (GFP-CTD) auf die Expression von Retrotransposons	57
Abbildung 16: Expressionsregulation verschiedener Transposons zwischen AX2 und Knock-out-Stämmen.	60
Abbildung 17: Chromatin-Immunopräzipitation der Promotorsequenz von DDB_G0282815 mit zwei Antikörpern gegen CbfA und mit IgG gegen den TAP-tag des Fusionsproteins NTAP-NYFP-CbfA ⁶¹⁻¹⁰⁰⁰	63
Abbildung 18: Gelelektrophorese von amplifizierten Genen aus einer CbfA-ChIP.....	64
Abbildung 19: Anreicherung der Clustergensequenzen gegenüber ihrer Negativprobe.....	65

Abbildung 20: Prozentuale Anreicherung von genomischer DNA mittels CbfA-ChIP gegenüber dem Input.....	66
Abbildung 21: PCR-Produkte verschiedener Gene an vegetativen und sich entwickelnden <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	67
Abbildung 22: PCR-Produkte einer CbfA-ChIP von vegetativ wachsenden und sich sechs Stunden entwickelnden <i>D. discoideum</i> -Zellen.....	68
Abbildung 23: Berechnung der vielfachen Anreicherung an präzipitierter DNA von t0 zu t6.	68
Abbildung 24: Mutagenese- und Klonierungsschema zur Herstellung von Deletionsmutanten von NTAP-NYFP-CbfA ⁶¹⁻¹⁰⁰⁰	70
Abbildung 25: <i>Western-Blot</i> der Proteinexpression verschiedener CbfA-Derivate aus JH.D(ura ⁻) bzw. AX2-Zellen.....	71
Abbildung 26: Multizelluläre Entwicklung von NTAP-NYFP-CbfA ⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ und verschiedener CbfA-Mutanten in JH.D(ura ⁻) auf Agar-Phosphatplatten.....	73
Abbildung 27: Immunofluoreszenzfärbung von di- und trimethylierten Lysinen an Position 4 bzw. 9 von Histon H3.....	75
Abbildung 28: <i>Western-Blot</i> -Analysen der Peptid-Pull-down-Assays unter Verwendung von AX2-Kernextrakt.....	77
Abbildung 29: Histon-ChIP-Analysen für unterschiedlich methyliertes Histone H3 vergleichend zwischen AX2 und JH.D	78
Abbildung 30: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA ²⁻³⁷⁰	81
Abbildung 31: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA ²⁻³⁷⁰ in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen.....	82
Abbildung 32: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA ²⁻³⁷⁰ in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen und bei unterschiedlichen Wachstumszeiten.	83
Abbildung 33: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA ²⁻³⁷⁰ in verschiedenen <i>E. coli</i> -Stämmen und bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen.....	83
Abbildung 34: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA ²⁻³⁷⁰ bei einer Kultivierung von 12°C.....	84
Abbildung 35: Aufreinigung des rekombinanten, in 6 M GuHCl denaturierten (His) ₆ -CbfA ²⁻³⁷⁰ aus BL21-CodonPlus (DE3)-Zellen (A) und <i>Western-Blot</i> -Analyse der Elution	85
Abbildung 36: Expressionsversuch des Fusionproteins CbfA ⁷⁻³⁷⁰ -(His) ₆ in BL21 CodonPlus-Zellen für 2 h bei 37°C	87
Abbildung 37: Aminosäuresequenz des Proteinderivates CbfA ⁷⁻³⁷⁰ -(His) ₆	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: Aufreinigung des Proteinderivates CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆ aus einer 1L Kultur des Rosetta TM -Expressionsstammes von <i>E. coli</i>	88
Abbildung 39: Screening von 15 verschiedenen Rückfaltungspuffern bei einem pH-Wert von 7,5 und einem pH-Wert von 10 für die Renaturierung des aufgereinigten CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆	89
Abbildung 40: Dialysierte Proteinfractionen gegen einen „nativen“ Puffer aus den Faltungsansätzen 6, 7 und 13.....	90
Abbildung 41: Chromatogramme analytischer Größenausschluß-Chromatographie von rückgefaltetes CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆ vor und nach der Dialyse gegen einen 150 mM NaCl-Puffer (pH 7,5).....	91
Abbildung 42: Chromatogramme der analytischen Größenausschluß-Chromatographie und Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele von Fraktionen des aufgereinigten und rückgefalteten CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆ -Proteins	92
Abbildung 43: Chromatogramme der analytischen Größenausschluß-Chromatographie unter modifizierten Bedingungen des aufgereinigten und rückgefalteten CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆ -Proteins.	94
Abbildung 44: Exemplarische Darstellungen des Interaktionsassays in dem Hefestamm AH109.....	96
Abbildung 45: Dreidimensionale Struktur und Proteinsequenz des <i>D. discoideum</i> Aktin 1.99	
Abbildung 46: Multialignment aller im Hefe-Screening gefundenen Proteinsequenzen von Aktin.....	100
Abbildung 47: Proteinschema unterschiedlicher Aktin-Konstrukte.....	101
Abbildung 48: Interaktionsassay der JmjC-Domäne mit verschiedenen Aktinkonstrukten im Hefe-Zwei-Hybrid-System	102
Abbildung 49: Co-Immunopräzipitationen der JmjC-Domäne mit verschiedenen Interaktionspartnern	104
Abbildung 50: Resultat des <i>Pull-down</i> – Experimentes von NTAP-NYFP-Set1 (AS 177-328) mit Kernextrakt von AX2-Zellen.....	105
Abbildung 51: Proteinschema der Histon-Methyltransferase Set1 von <i>D. discoideum</i>	116
Abbildung 52: Proteinstruktur von CbfA aus <i>Dictyostelium discoideum</i> und DMM-1 aus <i>Neurospora crassa</i>	120

Abkürzungen

Ab	<i>antibody</i> , Antikörper
A, Ade	Adenin, Nukleobase, auch Auxotrophiemarker in Hefe
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin, Nukleobase
Cam	Chloramphenicol
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
Cbfa	C-Modul-bindender Faktor A
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunoprecipitation
Co-IP	Co-Immunoprecipitation
CTD	Carboxy-terminale Domäne, meist bezogen auf Cbfa
Cy3	Cyanin
Da (kDa)	Dalton; ein Dalton ist ein Zwölftel der Masse eines ¹² C-Atoms
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDT	<i>Dictyostelium</i> DNA Transposon
DGLT	<i>Dictyostelium gypsy like transposon</i>
DIRS	<i>Dictyostelium intermediate repeat sequence</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynucleotridtriphosphat, umfasst dATP, dCTP, dGTP, dTTP
ds	<i>double stranded</i> , doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
EN	Endonuklease
EST	<i>expressed sequence tag</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin, Nukleobase

Abkürzungen

GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grün fluoreszierendes Protein
HC	Histidin-Cystein-reiche Domäne
H, His	Histidin, Aminosäure, auch Auxotrophiemarker in Hefe
h	Stunde
HAC	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDM	Histon-Demethylase
HMT	Histon-Methyltransferase
ID	Genidentifikationsnummer
IF	Immunofluoreszenz
IN	Integrase
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galaktosid
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
JmjC	JumonjiC-Domäne
JmjN	JumonjiN-Domäne
kb	Kilobasen
L, Leu	Leucin, Aminosäure, Auxotrophiemarker in Hefe
LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Mb	Megabasen
MBP	Maltose-Bindeprotein
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MQ-Wasser	Milli-Q Wasser
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetische Säure
NLS	<i>nuclear localization sequence</i> , Kernlokalisierungssequenz
nm	Nanometer
NRD	Asparagin-reiche Domäne, meist bezogen auf CbfA
nt	Nukleotid

NTD	Amino-terminale Domäne, meist bezogen auf CbfA
OD	optische Dichte
2-OG	2-Oxoglutarat, α -Ketoglutarat
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PCR	<i>polymerase-chain-reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PHD	<i>plant homeo domain</i> , ein Zinkfinger Motiv
PR	Protease
PTGS	<i>post-transcriptional gene silencing</i>
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR an komplementärer DNA
RH	Ribonuklease H-Domäne
rpm	<i>rotations per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleinsäurepartikel
RT	reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sek	Sekunde
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
Tdd	Transposon in <i>Dictyostelium discoideum</i>
Tet	Tetracyclin
TRE	tRNA-Gen assoziiertes Retroelement
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
T, Trp	Tymin oder Tryptophan, Auxotrophiemarker in Hefe
tRNA	<i>transfer RNA</i> , Transfer-RNA
TSD	<i>target site duplication</i>
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierte Region
v/v	<i>volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , Masse pro Volumen
X- α -GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galaktopyranosid
X- β -GAL	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> , Gelb fluoreszierendes Protein
ZF	Zinkfinger

1 Einleitung

1.1 Epigenetische Genregulation

In der epigenetischen Forschung werden vererbare Modifikationen des Genoms untersucht, die nicht aufgrund von Veränderungen der DNA-Sequenz hervorgegangen werden. Modifikationen von DNA-Basen oder Histonresten können beispielsweise je nach Entwicklungszustand variieren und werden auf Tochterzellen übertragen. Diese Modifikationen spielen eine entscheidende Rolle in der Chromatindynamik und kontrollieren somit biologische Mechanismen wie beispielsweise Replikation, DNA-Reparatur, Transkription und Genom-Stabilität. Das Modifikationsmuster wird als epigenetischer Code bezeichnet und erweitert das Informationspotential des genetischen Codes.

DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen zählen zu den wichtigsten epigenetischen Regulationen. Sie verändern die Chromatinstruktur und verhindern bzw. ermöglichen dadurch die Transkription von Genen.

Eine Gen-Stillegung kann durch die von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) vermittelte Methylierung der Base Cytosin erfolgen, wobei fast ausschließlich das symmetrische Sequenzmotiv 5'-CpG-3' (CpG) als Ziel dient (Li, 2002). Anhäufungen von CpG-Dinukleotiden werden auch CpG-Inseln genannt und treten vermehrt in Promotorsequenzen auf. Die Transkriptionsaktivität des zugehörigen Genes wird somit durch den Methylierungsgrad bestimmt. Die DNA-Methylierung ist auch an der Inaktivierung des X-Chromosoms der Säuger beteiligt. Während bei den meisten Eukaryoten symmetrische CpG-Motive sofort nach Replikation des neu synthetisierten DNA-Stranges nach dem Muster des Elternstranges methyliert werden, können auch *de novo*-Methylierungen an asymmetrischen Sequenzmotiven (CpNpN; N = A, C, T) stattfinden (Ramsahoye *et al.*, 2000). In *Dictyostelium discoideum* beispielsweise werden die LTR-Retrotransposons DIRS-1 und Skipper an asymmetrischen C-Sequenzmotiven durch die DNA-Methyltransferase DnmA methyliert (Kuhlmann *et al.*, 2005). Die DNA-Methylierung ist eine reversible Modifikation. Eine Demethylierung kann zur Reaktivierung der stillgelegten Gene passiv durch Blockierung der Methylierungsreaktion nach Replikation oder aktiv an CpG-Motiven durch DNA-Demethylasen erfolgen (Ooi & Bestor, 2008).

DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen beeinflussen sich gegenseitig und greifen ineinander über. Beispielsweise sind Methyl-CpG-bindende Proteine in Proteinkomplexen mit Histon-Deacetylasen (HDACs) zu finden. Histon-Deacetylasen entfernen Acetyl-

gruppen von Histonen, wodurch die Chromatinkondensation noch verstärkt wird (Jones *et al.*, 1998; Nan *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu führen durch Histon-Acetyltransferasen (HACs) post-translational modifizierte Histonlysine zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur und ermöglichen dadurch die Transkription.

An Seitenketten von Arginin- und Lysinmolekülen der Histone erfolgen ebenfalls Veränderungen des Methylierungsstatus durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) bzw. Histon-Demethylasen (HDMs). Während die Di- und Trimethylierung von Lysinresten an Position 4 des Histons H3 eine Transkriptionsaktivierung charakterisiert, führt eine Di- und Trimethylierung des Lysinrestes an Position 9 zu einer Heterochromatisierung und damit zur Gen-Stillegung. Weitere post-translationale Modifikationen können u. a. durch Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung und Ubiquitinierung hervorgerufen werden. Die kombinatorischen Histon-Modifikationen werden als Histon-Code bezeichnet.

DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen zählen aufgrund ihrer Transkriptionsregulation zur Epigenetik im engeren Sinne. Im weiteren Sinne können auch kleine RNA-Moleküle den Packungszustand des Chromatins beeinflussen oder eine Genstillegung durch RNA-Interferenz hervorrufen. In diesem Fall blockieren kleine RNA-Moleküle die mRNA und verhindern somit die Translation.

1.2 Die JumonjiC-Domäne (JmjC)

Bei der Suche nach wichtigen Genen für die Morphogenese des Gehirns ist in einem „Gene Trap“-Experiment an Mäusen das Gen *jumonji* (*jmj*), dessen Aminosäuresequenz das Protein Jarid2 (Jumonji) bildet, identifiziert worden (Takeuchi *et al.*, 1995; 1997). Das Gen codierte u. a. für zwei hochkonservierte Bereiche, die aufgrund ihrer N-terminalen bzw. C-terminalen Lage im Protein als JmjN und JmjC beschrieben wurden (Balciunas & Ronne, 2000). Durch Homologie-Studien wurden über 100 weitere Proteine, die eine JmjC-Domäne besitzen, identifiziert (Clissold & Ponting, 2001). Aufgrund von Sequenz-ähnlichkeiten sind diese Proteine in acht Gruppen aufgeteilt worden. Durch die evolutionäre Verbreitung der JmjN- und JmjC-Domänen wird daher von funktionellen und strukturellen, unabhängigen Einheiten gesprochen. Sie sind weiterhin in Kombination mit anderen charakteristischen Proteindomänen von Transkriptionsfaktoren (PHD, C2H2, ARID/BRIGHT, Zinkfinger) identifiziert worden (Clissold & Ponting, 2001).

Für viele JmjC-Proteine konnten anhand von Sequenzanalysen, vergleichenden Studien der Sekundärstruktur und kristallographische Untersuchungen der Tertiärstruktur Charakteristika einer cupinähnlichen Enzymfamilie, der Eisen(II) und 2-Oxoglutarat (2-OG; α -Ketoglutarat) abhängigen Dioxygenasen, erkannt werden (Clissold & Ponting,

2001). In der enzymatischen Reaktion dieser Dioxygenasen wird das Substrat unter Bindung von zweiwertigem Eisen oxidiert. Gekoppelt an die Decarboxylierung von 2-Oxoglutarat werden beide Atome des molekularen Sauerstoffs in ihre Substrate eingebaut. Dabei entstehen neben dem hydroxylierten Substrat zusätzlich Succinat und Kohlenstoffdioxid. Die JumonjiC-Domäne besitzt eine Fassstruktur („*Jelly-Roll Motif*“), die aus acht antiparallelen β -Strängen gebildet wird, ein konserviertes Fe^{2+} -Bindemotiv der Form His-X-Asp/Glu- X_n -His sowie Bindestellen für 2-Oxoglutarat (Chen *et al.*, 2006; Clifton *et al.*, 2006) und stellt somit eine Form der Eisen (II) und 2-Oxoglutarat abhängigen Dioxygenasen dar.

Die Aufgaben von 2-OG-Dioxygenasen können sehr vielfältig sein. Sie spielen beispielsweise bei der Regulation der DNA-Reparatur im Falle von AlkB, bei der Zellreaktion auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen durch FIH-1 oder als Histon-Demethyhasen zur Chromatinmodifikation eine entscheidende Rolle.

Für das AlkB-Protein aus *E. coli* konnte eine Funktion in der DNA-Reparatur einzelsträngiger DNA nachgewiesen werden, bei der vermutlich 1-Methyladenosin oder 3-Methylcytosin als Zielbereich dienen (Dinglay *et al.*, 2000). Mittels Sequenzvergleiche konnte AlkB in die Superfamilie der 2-OG-Dioxygenasen eingeordnet werden, da es die typische Struktur dieser Enzyme mit Bindestellen für Fe^{2+} und 2-OG besitzt (Aravind & Koonin, 2001). Falnes *et al.* (2002) und Trewick *et al.* (2002) zeigten später eindeutig die Reparatur von N-methylierter DNA anhand oxidativer Demethylierung.

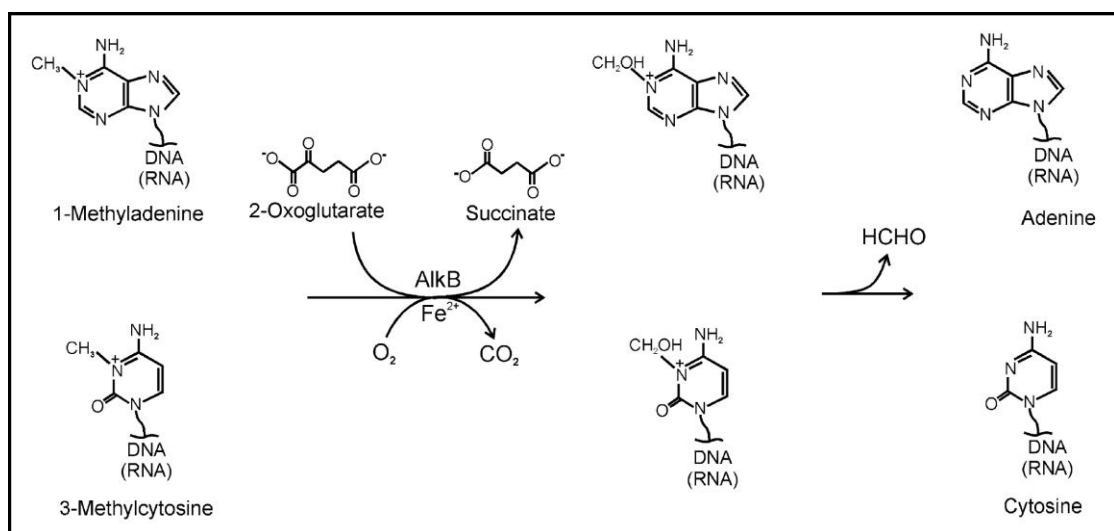


Abbildung 1: Mechanismus der DNA-Reparatur durch AlkB für 1-Methyladenosin (1-meA) und 3-Methylcytosin (3-meC). CO_2 : Kohlenstoffdioxid; HCHO : Formaldehyd; Abbildung aus Falnes & Rognes (2003)

AlkB oxidiert dabei die Methylgruppe der Base, wodurch ein instabiles Zwischenprodukt entsteht und durch spontane Abgabe von Formaldehyd die nicht alkylierte Ausgangsbasis

gebildet wird. Es wird dabei molekularer Sauerstoff in das Substrat eingebaut und 2-OG unter Entstehung von Succinat und Kohlenstoffdioxid decarboxyliert (Falnes & Rognes, 2003; Abbildung 1). Aktuell werden acht humane AlkB-Homologe vorausgesagt, von denen bisher für ABH2 und ABH3 eine Demethylaseaktivität an DNA und RNA nachgewiesen wurde (Aas *et al.*, 2003; Falnes *et al.*, 2007).

FIH-1 (*F*actor-*I*nhibiting *H*IF) ist ein Protein, dem erstmalig eine über seine JmjC-Domäne vermittelte 2-OG-Dioxygenasefunktion, nachgewiesen werden konnte. Es hydroxyliert das β -Kohlenstoffatom von Asparagin an Position 803 der humanen HIF-Untereinheit HIF α , wodurch unter normalen Sauerstoffbedingungen in der Zelle eine Expression Hypoxie-relevanter Gene unterdrückt wird. Anhand kristallographischer Untersuchungen von FIH-1 konnte für die zentrale Domäne das *Jelly-Roll*-Motiv mit der Fe²⁺-Bindestelle H199-X-D201-X_n-H279 festgestellt werden (Lee *et al.*, 2003).

Eine dritte Funktion zeigen 2-OG-Dioxygenasen bei der Demethylierung von Histonsseitenketten. Die zuvor durch Histon-Methyltransferasen vermittelte Methylierung besonders am Histon H3 und H4 ist eine post-translationale Modifikation, die weitreichende Prozesse, wie die Transkriptions-Aktivierung bzw. -Hemmung und die Chromatin-Strukturierung, reguliert (Kouzarides, 2007; Agger *et al.*, 2008). Im Vordergrund dieser epigenetischen Umgestaltung stehen die Lysin- oder Argininseitenreste dieser Histone. Während Lysin mono-, di- oder trimethyliert wird, ist bei Arginin entweder eine Mono- oder symmetrische bzw. asymmetrische Dimethylierung zu beobachten (Martin & Zhang, 2005; Bedford & Richard, 2005). Dass diese Histonmodifikationen reversibel sind, wurde mit der Identifizierung des LSD1 (*L*ysine-*S*pecific *H*istone *D*emethylase) bekannt. Diese erste „echte“ Histon-Lysin-Demethylase führte direkt am Lysin 4 und 9 des Histons H3 als flavinabhängige Oxidase eine Demethylierungsreaktion durch (Shi *et al.*, 2004; Metzger *et al.*, 2005). Nachfolgend konnten weitere Enzyme mit Demethylasefunktionen an Lysinresten gefunden werden. Besonders in die Klasse der JmjC-Proteine wurden weitere Histon-Demethylasen identifiziert. Jedes dieses Enzyme gehört der Familie der 2-OG-Dioxygenasen an und katalysiert eine Demethylierung an Lysin 4, 9, oder 36 von Histon H3 (H3K4, H3K9, H3K36), wobei nicht nur mono- und dimethylierte, sondern auch trimethylierte Lysine als Zielbereich dienen (Tsukada *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2006; Whetstone *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2006a; Cloos *et al.*, 2006; Fodor *et al.*, 2006). Neben Histon-Lysin-Demethylasen konnte bisher nur eine JmjC-Domäne tragende Histon-Arginin-Demethylase namens JMJD6 identifiziert werden, die Arginin an Position 2 im Histon H3 (H3R2) bzw. an Position 3 im Histon H4 (H4R3) demethyliert (Chang *et al.*, 2007).

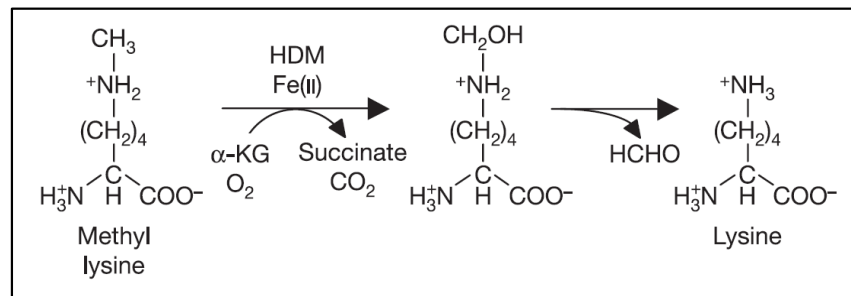


Abbildung 2: Demethylierungsreaktion eines Lysinrestes über eine Hydroxylierung unter Verwendung von Fe²⁺ und 2-OG durch ein JmjC-Domäne enthaltende Demethylase: HDM: Histon-Demethylase; α-KG: α-Ketoglutarat (2-Oxoglutarat); HCHO: Formaldehyd; Abbildung aus Tsukada *et al.* (2006)

Die JmjC-Domäne von Histon-Demethylasen kann unter Bindung von Fe²⁺ und mit Hilfe von 2-Oxoglutarat mono-, di- und trimethylierte Lysinreste über einen oxidativen Mechanismus demethylieren (Abbildung 2). Dabei werden zwei Sauerstoffatome auf ihre Substrate übertragen, wodurch Succinat, Kohlenstoffdioxid und eine hydroxylierte Methylgruppe am Lysinrest entstehen. Diese Methylgruppe wird sofort als Formaldehyd abgegeben (Klose *et al.* 2006b). Eine identische Reaktion findet an methylierten Argininresten statt, wobei zusätzlich Ascorbat zur optimalen Aktivität benötigt wird (Ozer & Bruick, 2007).

Anhand phylogenetischer Untersuchungen, Sequenzanalysen und der vorhandenen Domänenstruktur konnten 98 JmjC-Proteine verschiedener Modellorganismen in sieben Gruppen unterteilt werden (Klose *et al.*, 2006b). Sechs dieser Gruppen werden von Proteinen gebildet, die neben der JmjC-Domäne mindestens eine zusätzliche funktionelle Proteindomäne besitzen. Die siebente Gruppe beinhaltet Proteine, die nur die JmjC-Domäne als funktionelle Einheit aufweisen. Das in dieser Arbeit untersuchte JmjC-Protein CbfA ist jedoch nicht in dieser Analyse mit einbezogen worden.

1.3 *Dictyostelium discoideum* – Modellorganismus der sozialen Amöben

Dictyostelium discoideum ist ein eukaryotischer Organismus, dessen natürlicher Lebensraum die humusreichen Waldböden der gemäßigten Zonen sind. Als Nahrungsquelle dienen ihm Bakterien und andere, ähnlich große Mikroorganismen, die über Phagozytose aufgenommen werden. Bei ausreichendem Nahrungsangebot lebt *D. discoideum* als Amöbe solitär. Die amöboide Beweglichkeit während dieser vegetativen Wachstumsphase erhält der Einzeller durch charakteristisch ausgebildete Filo- und Pseudopodien. Bei Nahrungsmangel bilden zahlreiche Amöben nach Induktion der Entwicklungsphase einen vielzelligen Organismus aus. Dabei differenzieren sich die Zellen zu unterschiedlichen

Zelltypen und bilden Sporen, die widrige Bedingungen überdauern, um letztendlich wieder einzellige Organismen hervorzubringen.

Die erste wissenschaftliche Beschreibung der Gattung *Dictyostelium* hatte Mitte des 19. Jahrhunderts durch Oskar Brefeld stattgefunden (Brefeld, 1869). Er fand Sporen der Art *Dictyostelium mucoroides* und leitete mit dieser Entdeckung die Erforschung der Dictyosteliidae ein. Die Art *Dictyostelium discoideum* wurde erst im Jahre 1933 von Kenneth B. Raper in den Wäldern der *North Carolina Mountains* (USA) entdeckt und zwei Jahre später beschrieben (Raper, 1935). Sein *D. discoideum*-Isolat NC4 ist der Vorläufer des aktuell verwendeten Laborstammes AX2, welcher in der vorliegenden Arbeit als Wildtyp diente (Raper & Smith, 1939; Sussmann & Sussmann, 1967).

1.4 Die phylogenetische Stellung von *D. discoideum* im System der Eukaryoten

Die Phylogenie der einzelligen Eukaryoten ist über einen längeren Zeitraum kontrovers diskutiert und erst in jüngster Zeit aufgeklärt worden. Dabei hat die phylogenetische Stellung der Dictyosteliden einige Veränderungen erfahren. Nach der irrtümlichen Einordnung des Taxons als Vertreter der Pilze (Brefeld, 1869) konnte durch Analysen von Aktin und β -Tubulin das Monophylum der Schleimpilze (Mycetozoa), bestehend aus den zellulären (Dictyostelia), den plasmoidalen (Myxogastria) und protosteliden Schleimpilzen gebildet werden (Baldauf & Doolittle, 1997). Charakteristisch für diese Gruppe waren das Durchlaufen eines Entwicklungszyklus und die Ausbildung eines multizellulären Fruchtkörpers (Olive & Stoianovitch, 1975; Baldauf & Doolittle, 1997; Baldauf *et al.*, 2000). Die Bezeichnung als „Schleimpilz“ ist nur bedingt für Dictyosteliden anzunehmen, da diese weder eine saprophytische Ernährungsweise besitzen noch echte Plasmodien erzeugen. Der aktuell verwendete, wissenschaftliche Begriff dieser Gruppe lautet daher soziale Amöben (*social amoebas*).

Die Stellung der Mycetozoa konnte im System der Eukaryoten in weiteren phylogenetischen Analysen durch die Kombination mehrerer Proteindatensätze charakterisiert werden. Gemeinsam mit dem Taxon Lobosa bilden die Mycetozoa die Gruppe der Amoebozoa, welche als Schwestergruppe der Opisthokonta (Metazoa und Fungi) gesehen wird (Baldauf *et al.*, 2000). Unterstützt wird dieses Schwestergruppenverhältnis durch einige Genfusionen, die nur *Dictyostelium*, den Pilzen und den tierischen Vielzellern gemein sind (Nara *et al.*, 2000).

Eine Untersuchung von mehr als 100 Proteinsequenzen und der Vergleich von mehr als 5.000 Proteinclustern konnten ebenfalls zeigen, dass *Dictyostelium* als Vertreter der Mycetozoa

nach der Abzweigung der Pflanzen, jedoch vor der Aufspaltung der Pilze und Vielzeller, innerhalb der *crown group* (Abbildung 3) phylogenetisch einzuordnen ist (Baptiste *et al.*, 2002; Eichinger *et al.*, 2005).

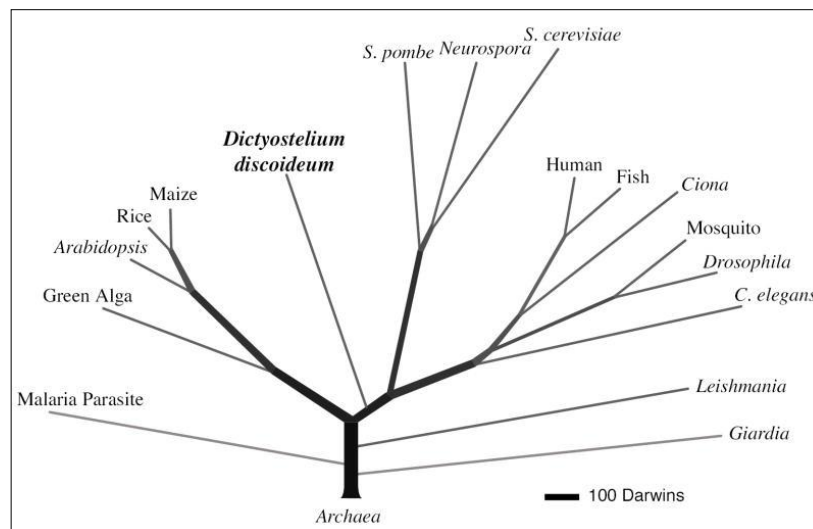


Abbildung 3: Proteombasierende Phylogenie der Eukaryoten. Rekonstruktion des phylogenetischen Baumes aus 5.279 orthologen Proteinclustern der 17 dargestellten Taxa anhand der *Maximum-Likelihood*-Methode. Die Wurzel ist durch 159 Proteincluster von sechs Archaea-Proteomen gebildet. Die relative Ast-Länge ist als „Darwin“ angegeben (1 Darwin = 1/2.000 genetischer Unterschied zwischen Hefe und Mensch). Verändert durch Eichinger *et al.* (2005).

1.5 Der Lebenszyklus von *Dictyostelium discoideum*

Der Lebenszyklus von *D. discoideum* wird in zwei voneinander getrennte Phasen unterteilt: die vegetative Wachstumsphase und die multizelluläre Entwicklungsphase.

Während der vegetativen Phase ernährt sich der 8 bis 12 µm große Einzeller von Bakterien, die über einen unspezifischen Rezeptor erkannt werden (Bozzaro & Ponte, 1995). Der Organismus bewegt sich aufgrund der Polymerisation von Aktin- und Myosinfilamenten und der damit verbundenen Ausbildung von Pseudopodien chemotaktisch auf die Nahrungsquelle zu (Parent & Devreotes, 1996). Für eine einzige Zellteilung, die alle vier Stunden erfolgen kann, phagozytiert und verwertet die Amöbe bis zu 1.000 Bakterien (Mutzel, 1991; Clarke & Maddera, 2006). Der selektionierte Laborstamm AX2, der mittels Pinocytose ausreichend Nährstoffe für die Kultivierung in axenischem Medium aufnehmen kann, benötigt zwischen 10 und 12 Stunden für eine Zellteilung (Watts & Ashworth, 1970). Der Übergang von der vegetativen Wachstumsphase in die multizelluläre Entwicklung wird durch Nahrungsmangel, hohe Zelldichte und bestimmte Grenztemperaturen eingeleitet. Dabei reagieren die Zellen u. a. auch auf Faktoren des *Quorum-Sensing-Systems* (Clarke & Gomer, 1995). In der 24 bis 30 Stunden andauernden Entwicklungsphase werden durch umfangreiche Zelldifferenzierungen morphologische Veränderungen, vor allem die Ausbildung eines Fruchtkörpers, vollzogen.

Einleitung

Während der ersten sechs bis sieben Stunden strömen einzelne Individuen zu einem Aggregationszentrum hin, indem sie durch Schrittmacherzellen, die periodisch zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) sezernieren, angelockt werden (Loomis, 1993). Die charakteristische Bewegung auf astförmigen Bahnen (*Streaming*) wird durch den zum Zentrum hin ansteigenden cAMP-Gradienten hervorgerufen, der chemotaktisch wahrgenommen wird. Das aus bis zu 100.000 Zellen bestehende Aggregat (Kessin, 2001) bildet ein Pseudoplasmodium (*Slug*) aus und kann sich auf abiotische Signale einstellen und bewegen. Etwa 10 Stunden nach Induktion der Entwicklungsphase führen Veränderungen in der Genexpression entwicklungsrelevanter Gene zur Differenzierung verschiedener Zelltypen. Etwa 15 % der Zellen wandern als Prästielzellen unter Ausbildung einer Stielröhre (*Mexican Hat*) zum Boden des Pseudoplasmodiums und schwellen stark an, wodurch die Präsporenzellen, 75 % aller Zellen, angehoben werden (Kulmination). Die innerhalb der Präsporenzellen verstreut liegenden *Anterior-Like Cells* (ALC, 10 % der Zellen) sind eng mit den Prästielzellen verwandt und bilden im weiteren Verlauf die obere und untere Kappe der Sporenmasse (Firtel, 1996). Während die Stielzellen durch den programmierten Zelltod sterben, durchlaufen die Sporenzellen eine Phase der Dormanz bis wieder ideale Umweltbedingungen vorherrschen und die Amöben erneut in die vegetative Wachstumsphase eintreten können (Cotter *et al.*, 1992). In Abbildung 4 ist der Entwicklungszyklus in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme dargestellt.

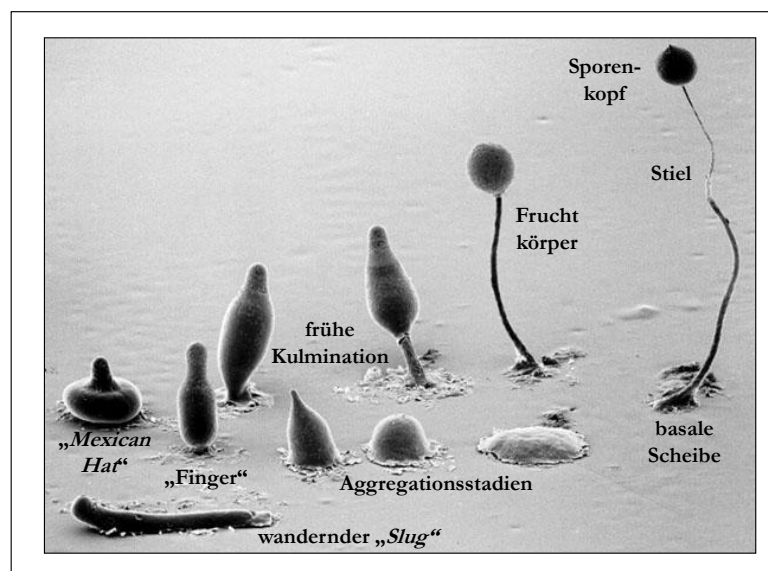


Abbildung 4: Die multizelluläre Entwicklungsphase von *D. discoideum*. Elektronenmikroskopische Aufnahme; Copyright, M.J. Grimson & R.L. Blanton, Biological Sciences Electron Microscopy Laboratory, Texas Tech University.

1.6 Regulation der frühen multizellulären Entwicklung

Die Initiation der multizellulären Entwicklung der Amöbe *Dictyostelium discoideum* kommt durch ein komplexes Zusammenspiel von Signalproteinen zustande, welches zur Aktivierung entwicklungsrelevanter Gene führt. Der in dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsregulator CbfA spielte hierbei eine wesentliche Rolle, da in Abhängigkeit seines Expressionslevels mehrere Entwicklungsmarker aktiviert wurden (Winckler *et al.*, 2001, 2004; Siol *et al.*, 2006a). Die molekularen Ereignisse beim Übergang von der Wachstums- in die Entwicklungsphase sollen daher in diesem Kapitel dargelegt werden (Abbildung 5).

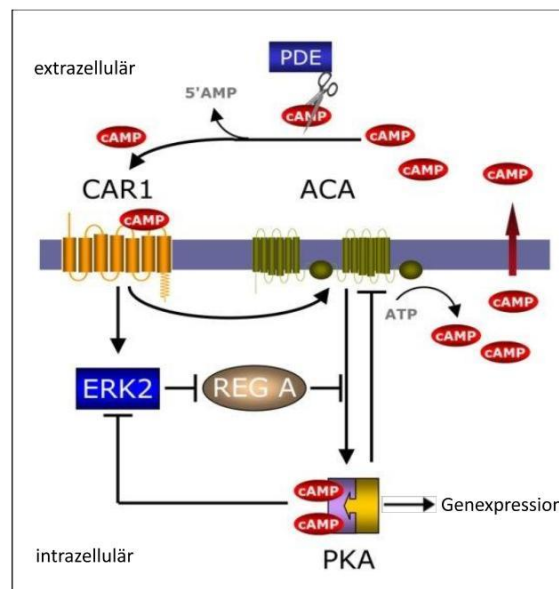


Abbildung 5: Regulatorisches Netzwerk während der frühen Entwicklungsphase von *D. discoideum*. ACA: Adenylzyklase A; CAR1: cAMP-Rezeptor 1; ERK2: *Extracellular Signal-Regulated Kinase 2* (MAP-Kinase); REG A: intrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase; PDE: extrazelluläre cAMP-Phosphodiesterase; PKA: Proteinkinase A; Abbildung nach Loomis (1998).

Während der vegetativen Phase wird der autokrine Faktor PSF (*Pre Starvation Factor*) sekretiert, durch den *D. discoideum* das Verhältnis seiner Populationsdichte zur Bakterienanzahl wahrnehmen kann. Bei einem kritischen Verhältnis führt die steigende Konzentration von PSF zur Expression verschiedener Proteine wie Discoidin-I, CMF (*Conditioned Medium Factor*) und dem membranständigen Rezeptor CAR1 (Clarke & Gomer, 1995; Rathi & Clarke, 1992). In diesem „Hungerzustand“ wird durch CMF die Zelldichte bestimmt, da eine Aggregation nur mit einer gewissen Anzahl von Amöben erfolgen kann. Vermutlich kontrolliert CMF durch die Bindung an seinen membranständigen Rezeptor ebenfalls die Aktivierung von CAR1 durch cAMP (van Haastert *et al.*, 1996). CAR1 ist in der Wachstumsphase nur gering exprimiert und wird nach Einleitung der Entwicklung unabhängig von der cAMP-Konzentration vermehrt gebildet (Iranfar *et al.*, 2003). Dieser

Einleitung

aktivierte Rezeptor bindet nun zyklisches AMP (cAMP), das in der Entwicklungsphase als primärer und sekundärer Botenstoff essentiell ist.

Die ersten Zellen, die das Signalmolekül cAMP aussenden, sind die sogenannten Schrittmacherzellen (Loomis, 1993). Die vermehrte Bindung von cAMP an CAR1 führt über einen G-Protein abhängigen Mechanismus in Verbindung mit CRAC (*Cytosolic Regulator of Adenylyl Cyclase*) schnell zur gesteigerten Produktion der Adenylylzyklase (ACA) und zur Aktivierung der MAP-Kinase ERK2 (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Knetsch *et al.*, 1996; Maeda *et al.*, 1996; Abbildung 5).

ACA wandelt ATP in cAMP um, wodurch die Konzentration von cAMP in der Zelle und durch Sekretion außerhalb der Zelle ansteigt. Extrazellulär ist durch dieses Signalmolekül eine Weiterleitung des Signals an benachbarte Zellen gewährleistet. Intrazellulär werden G-Protein-abhängige und -unabhängige Prozesse gesteuert oder längerfristig Gene aktiviert, deren Induktion von nanomolaren oder millimolaren cAMP-Konzentrationen abhängt (Loomis, 1998). Der Transkriptionsregulator CbfA hält vermutlich eine basale Transkriptionsaktivität der *acaA*-Expression nach Beginn der Entwicklungsphase aufrecht, da in CbfA-supprimierten Zellen bestimmte Gene, u. a. *acaA*, im frühen Entwicklungszustand nicht oder nur sehr gering aktiviert waren, und dadurch ein Aggregationsdefekt auftrat (Siol *et al.*, 2006a).

Die Proteinkinase ERK2 inhibiert durch Phosphorylierung die Aktivität die cAMP-Phosphodiesterase RegA, wodurch die Anreicherung des Signalstoffes erfolgen kann.

Im weiteren Verlauf der Signalkaskade spielt die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) eine zentrale Rolle (Abbildung 5). Diese hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase besteht aus einer regulatorischen (PKA-R) und einer katalytischen Untereinheit (PKA-C) und befindet sich als Heterodimer in einem inaktiven Zustand. Steigt die Konzentration von cAMP intrazellulär über einen Wert von 100 nM, bindet cAMP an die regulatorische Untereinheit, wodurch das Heterodimer auseinander dissoziiert (Gerisch & Hess, 1974). Die Untereinheit PKA-C initiiert nun die Transkription entwicklungsrelevante Gene. Vermutlich wird auch das ACA codierende Gen (*acaA*) von PKA-C in dessen Transkription beeinflusst, da *pka*-Mutanten keine *acaA*-Transkription zeigten (Mann *et al.*, 1997). Gleichzeitig inhibiert PKA-C das Protein ERK2 durch die Regulation der Proteine RAS-GEF und RAS-GAP (Insall *et al.*, 1996; Aubry *et al.*, 1997). Die cAMP-Phosphodiesterase RegA wird nicht mehr inhibiert und baut den Signalstoff ab, wodurch die PKA als Heterodimer wieder inaktiv vorliegt. PKA regelt sich über diesen positiven Rückkopplungsmechanismus selbst (Shaulsky *et al.*, 1998). Nachdem extrazellulär eine chemotaktische Wirkung von cAMP auf andere Amöben stattgefunden hat, wird es von

der Phosphodiesterase PdsA zu 5'-AMP abgebaut. Die Zellen können wieder stimuliert werden und der Rezeptor CAR1 reagiert auf cAMP (Segel *et al.*, 1986; Sugang *et al.*, 1997). Durch einen cAMP-Puls benachbarter Amöben beginnt der Kreislauf von neuem. Aufgrund der oszillierenden Aktivität der Adenylzyklase entstehen cAMP-Pulse in einem Abstand von ca. sechs Minuten.

Die Expression der Proteinkinase A ist für den weiteren Ablauf der Entwicklung notwendig. Das Protein beeinflusst neben der chemotaktischen Aggregation die Differenzierung der Prästiel- und Präsporenzellen sowie die terminale Differenzierung (Harwood *et al.*, 1992; Mann *et al.*, 1992; Parent & Devreotes, 1996).

1.7 Organisation des Genoms

Das haploide Genom von *Dictyostelium discoideum* umfasst 34 Millionen Basenpaare, die sich auf sechs Chromosomen mit einer Größe von 3,6 Mb bis 8,6 Mb und ein 88 kb großes extra-chromosomales Palindrom verteilen (Eichinger *et al.*, 2005). Interessanterweise besitzen die axenischen Stämme AX3 und der daraus entstandene Stamm AX4, jedoch nicht der parentale Stamm NC4 sowie AX2, auf Chromosom 2 eine 750 kb große Duplikation, die ca. 280 Gene beinhaltet (Loomis, 2006). Möglicherweise hat während der Mutagenese des NC4-Stammes mit Nitrosoguanidin zur Herstellung von AX3 und AX4 und der anschließenden Selektion auf HL5-Medium ein „Breakage-Fusion-Bridge“-Ereignis stattgefunden (McClintock, 1951).

Das palindromische Element codiert für Gene der 5,8S-, 17S-, 26S- und 5S-rRNA und ist ebenfalls im Zellkern mit 100 Kopien lokalisiert (Sugang *et al.*, 2003). Seine ursprüngliche Sequenz stammt vermutlich von Chromosom 4, da der zentrale 3,2kb-Bereich des Palindroms dort wieder zu finden ist.

Zusätzlich befindet sich im Zellkern ein 1,5 bis 27 kb großes Plasmid (*Dictyostelium discoideum* Plasmid, Ddp), das bei bestimmten *Dictyostelium*-Stämmen bis zu 300 Kopien vorweisen kann (Kiyosawa *et al.*, 1993; Shammat *et al.*, 1998, 1999). Es beinhaltet das *rep*-Gen, dessen Produkt die autonome Replikation und Plasmidanzahl reguliert.

Jede Amöbe besitzt zudem 200 Mitochondrien, die je eine Kopie der mitochondrialen DNA enthalten. Dieses mitochondriale Genom besteht aus 55,6 kb und besitzt 41 Gene, die neben Proteinen des Energiestoffwechsels für zwei rRNAs und 18 tRNAs codieren (Ogawa *et al.*, 2000).

Charakteristisch für das Genom von *D. discoideum* ist der überdurchschnittlich hohe A/T-Gehalt von 78 %. Während in den Exon-Bereichen ein A/T-Anteil von 73 % vorhanden ist, kann dieser in den nicht codierenden, homopolymeren Bereichen bis zu 96 % betragen.

Centromere verteilen während der Zellteilung Chromatide eukaryotischer Chromosomen gleichmäßig auf beide Tochterzellen, können jedoch in ihrer Struktur und Organisation sehr unterschiedlich sein (Eichler & Sankoff, 2003). Chromosomen von *Dictyostelium discoideum* besitzen an einem Ende einzelne Cluster mit sich wiederholenden Sequenzen des Retrotransposons DIRS-1 (*Dictyostelium Intermediate Repeat Sequence*). Da diese strukturellen Elemente beständig auftreten, wird eine Centromer-ähnliche Funktion diskutiert (Eichinger *et al.*, 2005).

Eine Telomer-Struktur konnte bisher nicht identifiziert werden. Dennoch zeigen alle Chromosomenenden repetitive Elemente, denen palindromische rDNA-Bereiche folgen. Vermutlich dienen diese Teilbereiche als Telomere (Eichinger *et al.*, 2005).

Dank der Untersuchung des internationalen „*Dictyostelium* Genom Projektes“ steht seit 2005 die genomische Sequenz des Stammes AX4 zur Verfügung. Demnach werden *D. discoideum* 12.500 Gene zugeordnet (Eichinger *et al.*, 2005; *International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004). Die durchschnittliche Länge eines Gens umfasst 1.400 Basenpaare, wobei zwischen den Genen nur sehr kleine Abstände von ca. 800 bp vorhanden sind. In diesen Bereichen sind regulatorische Elemente, wie beispielsweise Promotoren und Terminatoren, zu finden. Im Genom von *D. discoideum* bestehen 60 % der genomischen DNA aus Exons proteincodierender Gene, während dies nur für 1 % des humanen Genoms der Fall ist.

Im dicht gepackten *Dictyostelium*-Genom befindet sich zusätzlich eine Anzahl von 390 tRNA-Genen (Loomis, 2006). Non-LTR-Retrotransposons (TRE3- und TRE5-Elemente), die ca. 3,7 % des Genoms darstellen, integrieren in der Nachbarschaft von tRNA-Genen. Insgesamt beträgt der genomische Anteil transposabler Elemente ca. 10 % (Glöckner *et al.*, 2001).

1.8 Transposable Elemente im Genom von *D. discoideum*

Für den C-Modul-bindenden Faktor A (CbfA), dessen Erforschung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, konnte *in vitro* bereits eine Interaktion mit dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A gezeigt werden (Horn *et al.*, 1999). In diesem Kapitel wird daher ein Überblick über die in *D. discoideum* vorhandenen Transposons gegeben.

Transposable Elemente (TEs) sind eine Form der genetischen Elemente, die ihre Position im Genom durch eine Transposition verändern können. Die amerikanische Wissenschaftlerin Barbara McClintock hat erstmalig derartige DNA-Bereiche im Mais entdeckt (McClintock, 1951). Seitdem konnten in nahezu allen dahingehend untersuchten Organismen Transposons nachgewiesen werden. Dabei ist der Transposongehalt im

Genom jedes Organismus verschieden. Beispielsweise beträgt der TE-Anteil von *Saccharomyces cerevisiae* nur 3-5 %, während er bei *Zea mays* bereits 60 % des Genoms ausmacht (SanMiguel *et al.*, 1996; Biémont & Vieira, 2006). Das Genom einer *D. discoideum*-Zelle besteht zu 10 % aus transposablen Elementen, wobei je nach Art des Transpositions-Mechanismus zwischen Retrotransposons (Klasse I) und DNA-Transposons (Klasse II) unterschieden wird (Abbildung 6).

Für die Transposition verwendet das Transposon verschiedene Enzyme, die entweder vom Element selbst codiert oder durch andere Transposons zu Verfügung gestellt werden. Integriert das transposable Element im Genom, erzeugt es einen versetzten Schnitt mit einer Länge von wenigen bis einigen tausend Basen. Dieser Schnitt wird nach der Integration durch zelluläre Reparaturmechanismen komplementär aufgefüllt. Es entstehen dabei oberhalb und unterhalb des neu integrierten Transposons Zielsequenzverdopplungen (*Target Site Duplication*, TSD), die für jedes Transposon charakteristisch sind.

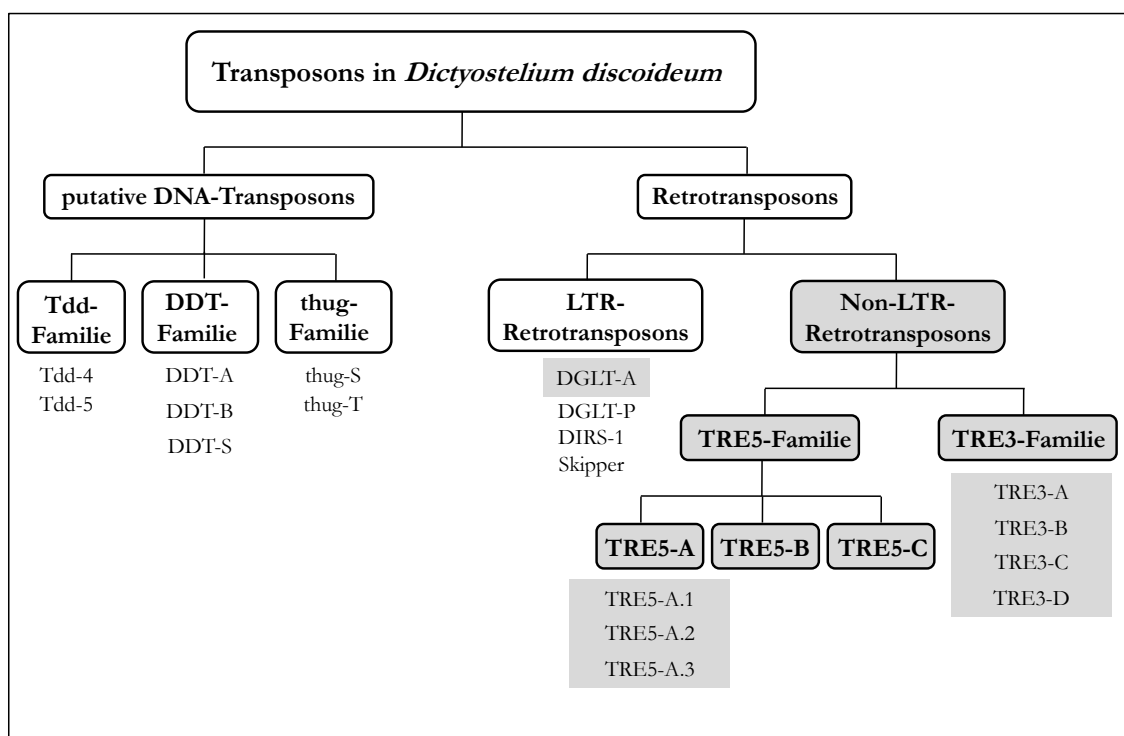


Abbildung 6: Überblick der in *D. discoideum* vorhandenen Transposons. Grau unterlegt: Elemente integrieren in Nachbarschaft von tRNA-Genen; nach Beck (2002).

1.8.1 DNA-Transposons

DNA-Transposons sind einfach strukturierte, mobile genetische Elemente, deren Transposase-Gen von invertierten, repetitiven Sequenzen (*Inverted Terminal Repeats*, ITRs) flankiert wird. Die Transposition wird durch dieses Enzym vermittelt, welches das Transposon aus dem Genom ausschneidet und an einem anderen Ort integriert („*Cut and*

Paste“-Mechanismus). Von den ca. 10 % der transposablen Elemente des *D. discoideum*-Genoms stellen sie mit 1,5 % den kleineren Anteil dar (Winckler *et al.*, 2002).

Dictyostelium discoideum werden drei Familien von putativen DNA-Transposons anhand der Ergebnisse aus dem „*Dictyostelium* Genom Projekt“ zugeordnet, wobei keiner der sieben Vertreter dieser Gruppen eine Ähnlichkeit zu DNA-Transposons anderer Organismen zeigte (Abbildung 6; Glöckner *et al.*, 2001).

1.8.2 Retrotransposons

Retrotransposons verwenden zur Transposition im Gegensatz zu DNA-Transposons den „*Copy and Paste*“-Mechanismus. Dafür werden unter Verwendung der Transkriptions-Maschinerie der Wirtszelle mehrere mRNA-Intermediate erstellt, die zum einen für die Expression verschiedener Transposonproteine dienen und zum anderen mit Hilfe der reversen Transkriptase zu einer DNA-Kopie synthetisiert werden, um anschließend an einer neuen Stelle ins Genom integriert zu werden. Die Zahl der Retrotransposon-Kopien wird durch diesen Mechanismus vermehrt, so dass dies zu einer Expansion des Genoms führt. Ihr derzeitiger Anteil im Genom von *D. discoideum* beträgt 8,1 % (Winckler *et al.*, 2002). Die Klasse der Retrotransposons wird je nach Vorhandensein oder Abwesenheit von Long Terminal Repeats (LTR) in LTR- oder Non-LTR-Retrotransposons eingeteilt (Capy, 2005).

1.8.2.1 LTR-Retrotransposons

Die LTR-Bereiche enthalten 200 bis 600 bp lange Signalsequenzen, beispielsweise Promotor- und Enhancerbereiche oder eine poly(A)-Sequenz, welche die Transposition initiieren oder steuern. LTR-Retrotransposons besitzen zwei sich überlappende ORFs (Open Reading Frame), die als *gag* und *pol* bezeichnet werden. Das *gag*-Gen codiert die strukturellen Proteine Capsid (CA) und Nukleocapsid (NA), die zur Ausbildung virusähnlicher Partikel dienen. Der zweite ORF codiert für das *pol*-Gen, wodurch die Domänen Protease (PR), reverse Transkriptase (RT), Ribonuklease H (RH) und Integrase (IN) gebildet werden. Die LTR-Retrotransposons werden je nach Abfolge der Domänen im *pol*-Gen, des Vorhandenseins von RNA-*priming* und anhand des *env*-Gens nochmals in vier Familien (Ty1, *Copia*, Ty3 & *Gypsy*) unterschieden (Capy, 2005). Wichtige Vertreter der LTR-Retrotransposons im Genom von *D. discoideum* sind DIRS-1 mit 235 Kopien, Skipper mit 60 Kopien und DGLT-A mit 20 Kopien (Winckler *et al.*, 2005).

1.8.2.2 Non-LTR-Retrotransposons

Lange, terminale Wiederholungseinheiten fehlen den Non-LTR-Retrotransposons. Sie besitzen untranslatierte Regionen, welche die ORFs einrahmen. Für *Dictyostelium discoideum* wurden bisher sieben Non-LTR-Retrotransposons beschrieben, die aufgrund ihrer Integration in der Nachbarschaft von tRNA-Genen einheitlich als TREs (*tRNA gene-targeted RetroElements*) bezeichnet wurden (Abbildung 6). Elemente, die oberhalb (5') der tRNA-Sequenzen integrieren, werden TRE5 genannt, diejenigen die unterhalb (3') integrieren, als TRE3 bezeichnet (Abbildung 7). Die Integration aller TREs findet dabei orientierungsspezifisch mit dem 5'-Ende in Richtung der tRNA-Gene statt. Die Art des tRNA-Genes, und ob in dessen Umgebung bereits ein TRE integriert ist, scheint hierbei keine Rolle zu spielen. In *D. discoideum* weisen etwa 54 % aller tRNA-Gene ein Non-LTR-Retroelement in ihrer Nachbarschaft auf (Winckler *et al.*, 2005). Eine Integration in andere Transposoncluster, wie bei DIRS-1, findet nicht statt.

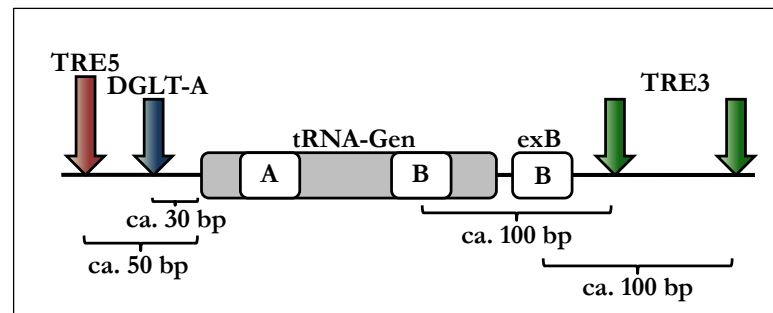


Abbildung 7: tRNA-Gen-assoziierte Integration der Non-LTR-Retrotransposons von *D. discoideum*. tRNA-Gene mit internen Promotorboxen (A und B). Bei vielen tRNA-Genen ist eine zusätzliche, externe Promotorbox (exB) vorhanden. Integrationspräferenz von TRE5-Elementen 50 bp oberhalb der Gene, von TRE3-Elementen 100 bp unterhalb der B-Box oder exB-Box von tRNA-Genen; DGLT-A (LTR-Retroelement) integriert 30 bp oberhalb der tRNA-Sequenz; Abbildung nach Winckler *et al.* (2005).

TRE5-A

TRE5-A, das nach seiner Entdeckung in den 1980er Jahren zunächst als DRE (*Dictyostelium Repetitive Element*) beschriebene, erste Element der TREs, wurde aufgrund der Erkennung von tRNA-Genen für die Integration in deren Nachbarschaft identifiziert (Marschalek *et al.*, 1989).

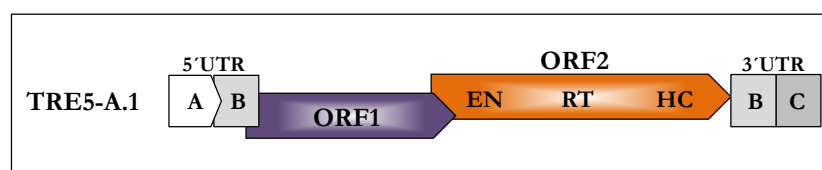


Abbildung 8: Struktur von TRE5-A.1. Non-LTR-Retrotransposons enthalten modular aufgebaute UTR-Regionen; EN: Endonuklease; RT: reverse Transkriptase; HC: Histidin-Cysteinreiche Domäne; Abbildung nach Winckler *et al.* (2005).

Einleitung

Im Genom von *D. discoideum* konnten bisher 70 TRE5-A-Retrotransposons erkannt werden. Diesem am intensivsten untersuchten Element wurden nach einer neuen Namensgebung als TRE5-A drei Subtypen (TRE5-A.1, TRE5-A.2, TRE5-A.3) anhand ihres modularen Aufbaus zugeordnet. TRE5-A.1 besteht aus 5.657 Basenpaare und besitzt zwei um 22 bp überlappende ORFs, die im Leseraster um -1 versetzt angeordnet sind (Marschalek *et al.*, 1992b). Der ORF1 codiert ein 51 kDa schweres Protein (ORF1p). Mehrere ORF1-Proteine bilden in Verbindung mit einem TRE5-A-Transkript Ribonukleinpartikel (RNPs) und stellen somit einen RNP-Präintegrationskomplex dar. Sie werden als Strukturproteine eingesetzt. Die Protein-Protein-Interaktion von ORF1p mit allen drei Untereinheiten des Transkriptionsfaktors IIIB führt dann zur Integration des Retroelements 44 bis 54 bp oberhalb von tRNA-Genen, wobei die Rekrutierung von TFIIB an die DNA zuvor durch TFIIC stattgefunden hat (Siol *et al.*, 2006b; Chung *et al.*, 2007).

ORF2 codiert für die drei abgegrenzten Domänen EN (Endonuklease), RT (reverse Transkriptase) und HC (Histidin-Cystein-reiche Domäne), die Homologien zu anderen Non-LTR-Retrotransposons zeigen (Malik *et al.* 1999; Yang *et al.*, 1999). Diese dienen als katalytische Komponenten während der Transposition.

Keines der von TRE5-A.1 codierten Proteine besitzt ein Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localization Signal, NLS). Vermutlich wandern die RNP-Präintegrationskomplexe während der Mitose, in der die Zellkernmembran teilweise degeneriert vorliegt, in den Nukleus ein.

Die ORFs von TRE5-A.1 sind von modular aufgebauten UTRs (Untranslated Regions) eingerahmt. Dabei besteht die 5'-UTR aus bis zu sieben A-Modulen und einem B-Modul, die 3'-UTR aus einem B-Modul und einem C-Modul (Abbildung 8).

Das A-Modul ist 200 bp lang und fungiert als Element-interner Promotor der Plus-Strang-RNA-Synthese (Schumann *et al.*, 1994). Das Transkript wird somit ab der ersten Base des A-Moduls erstellt und beinhaltet eine vollständige Promotorsequenz.

Das 290 bp lange B-Modul liegt unterhalb des A-Moduls und wiederholt sich als Duplikation ebenfalls in der 3'-UTR. Die Funktion dieses Moduls ist bisher nicht geklärt, jedoch besitzt es das Startcodon des ORF1-Proteins. Es besteht die Vermutung, dass es als ursprünglicher Promotor der TRE5-A.1-Elemente gedient hat und nach dem Gewinn des A-Moduls als stärkeren Promotor nicht länger aktiv gewesen ist (Winckler *et al.*, 2002).

Eine Duplikation des B-Moduls in der 3'-UTR wird gefolgt von einem 139 bp langen C-Modul. Das C-Modul agiert vermutlich als schwacher Promotor für die Minusstrang-RNA-Transkription. Zwischen diesen beiden Modulen befindet sich ein homomerer Poly-A-*Stretch* von 39 bp Länge (Marschalek *et al.*, 1992a).

De-novo-Integrationen von TRE5-A.1-Elementen finden häufig 5'-verkürzt statt. Diese Elemente sind nach der Integration durch den Verlust des Promotors inaktiv („*dead on arrival*“; Beck *et al.*, 2002).

Die strukturellen Unterschiede zwischen TRE5-A.1 mit TRE5-A.2 und TRE5-A.3 liegen in Deletionen des ORF2 und weiteren Deletionen in der 3'-UTR (Marschalek *et al.*, 1992a). Durch die partielle ORF2-Deletion ist TRE5-A.2 nicht mehr autonom und wird vermutlich von TRE5-A.1-Elementen *in trans* mobilisiert. Die Integration dieses ca. 2,3 kb langen Elementes findet im Gegensatz zum viel längeren TRE5-A.1 häufiger vollständig statt (Beck *et al.*, 2002).

Eine komplette Deletion beider ORFs ist bei Elementen des TRE5-A.3-Typs zu finden. Dieses „Minielement“ besteht nur aus den Modulen A, B und C. Die Aktivität des 700 bp langen Non-LTR-Retrotransposons ist unbekannt.

TRE5-B und TRE5-C

Weitere TRE5-Elemente, die positions- und orientierungsspezifisch oberhalb von tRNA-Genen integrieren, sind TRE5-B und TRE5-C. Die 5'-UTR-Region von TRE5-B besteht wie TRE5-A aus einer Kombination von einem oder mehreren A-Modulen sowie einem B-Modul (Szafranski 2002). Ein dupliziertes B- und ein C-Modul fehlen. TRE5-B-Elemente sind weniger stark im Genom vertreten. Es wurden bisher nur 15 Kopien gefunden.

TRE5-C stellt mit nur fünf vorhandenen Kopien im Genom von *D. discoideum* den geringsten Anteil dar. Da alle Kopien stark 5'-verkürzt sind, können diese Elemente bisher nur anhand der Daten aus dem „*Dictyostelium* Genom Projekt“ rekonstruiert werden. Vermutlich enthält es, wie TRE5-A und B, in der 5'-UTR ein A- und B-Modul sowie zwei sich überlappende ORFs. In der 3'-UTR ist ein C-Modul zu finden.

TRE3-Elemente

Anhand der Ergebnisse des „*Dictyostelium* Genom Projektes“ konnten dieser Non-LTR-Retrotransposongruppe die vier verschiedenen Elemente TRE3-A bis D zugeordnet werden (Glöckner *et al.*, 2001). Im Genom von *D. discoideum* sind ca. 60 Kopien von TRE3-A, 50 Kopien von TRE3-B, 30 Kopien von TRE3-C und 5 Kopien von TRE3-D identifiziert worden. Viele der analysierten TRE3-Elemente integrieren unterhalb von tRNA-Genen. Im Gegensatz zu TRE5-Elementen variiert ihr Integrationsort auffallend. Dies liegt vermutlich an der als Promotorsequenz identifizierten B-Box der tRNA-Gene, die als Bindestelle für den Transkriptionsfaktor IIIIC dient. Bei 66 % der tRNA-Gene liegt neben der internen B-Box zusätzlich eine *downstream* lokalisierte externe B-Box vor (Hoffmann *et al.*, 1991), die von TFIIC *in vitro* erkannt wird (Bukenberg *et al.*, 1994). Es

Einleitung

lässt sich daher eine Identifizierung von Integrationsorten durch Protein-Protein-Interaktionen der TRE3-Integrationsproteine mit TFIIC vermuten. Die TRE3-Integration kann an zwei alternativen Positionen zwischen 40 und 150 bp unterhalb von tRNA-Genen stattfinden, abhängig von der TFIIC-Bindung an die interne oder externe B-Box.

1.9 Struktureller Aufbau des C-Modul-bindenden Faktors A (CbfA)

Die Sequenz des CbfA-codierenden Gens ist unter der Bezeichnung AF052006 als GenBank®-Eintrag und mit der Gen-Identifikationsnummer DDB_G0279409 in der Dictyostelium-Datenbank „DictyBase“ (Chisholm *et al.*, 2006) zu finden. Im Genom von *D. discoideum* ist das *cbfA*-Gen auf Chromosom 3 an der Position 2.308.619 – 2.312032 lokalisiert. Die Gensequenz umfasst 3.414 bp und enthält ein 410 bp langes Intron im Bereich von Base 181 bis 591. Das CbfA-Protein besteht demzufolge aus 1000 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 114,27 kDa.

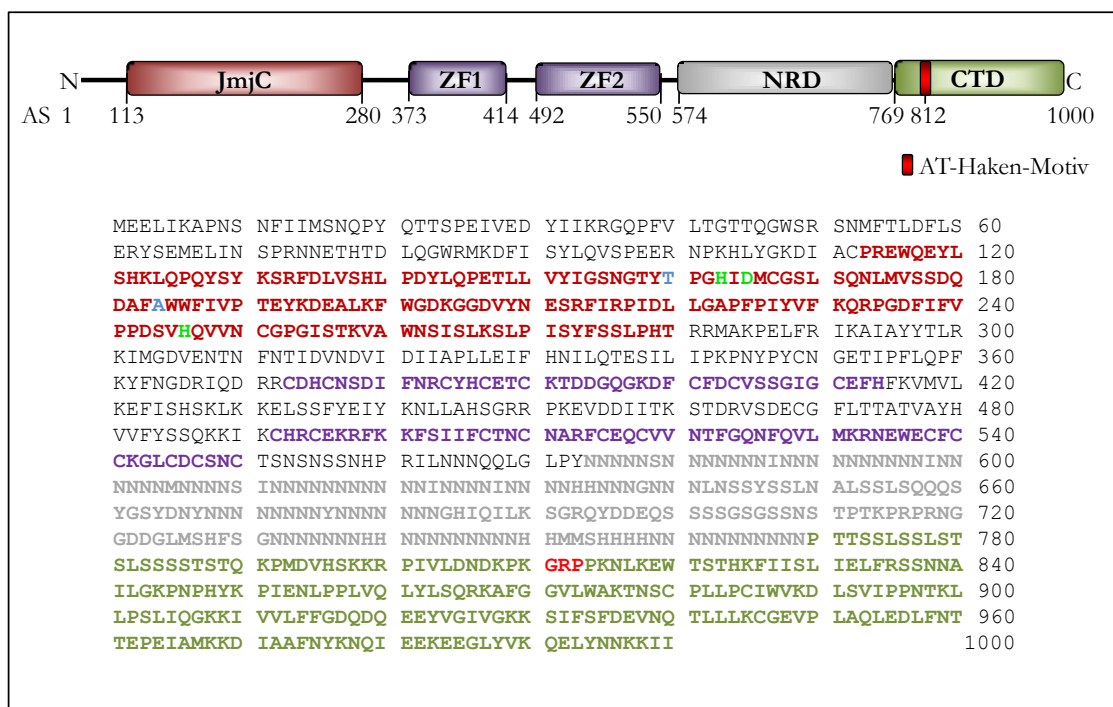


Abbildung 9: Darstellung der Domänenstruktur und der Aminosäuresequenz des Transkriptionsregulators CbfA. AS: Aminosäure; JmjC: JumonjiC-Domäne; ZF: Zinkfinger-Motive; NRD: Asparagin-reiche Domäne; CTD: carboxy-terminale Domäne inkl. des AT-Haken-Motivs; Helles Grün: Fe²⁺-Bindestellen der JmjC-Domäne; Blau: 2-OG-Bindestellen der JmjC-Domäne; Rot: zentrales Glycin-Arginin-Prolin-Motiv des AT-Hakens der CTD.

Der Transkriptionsregulator CbfA ist aus mehreren funktionell und strukturell unterschiedlichen Proteindomänen aufgebaut (Abbildung 9). Am N-Terminus weist CbfA eine Jumonji-Domäne (Jmj) auf. Diese Domäne wird als JmjC-Domäne bezeichnet, da sie Sequenzähnlichkeiten zur C-terminalen Jumonji-Domäne des Jumonji-Proteins aus *Mus musculus* zeigte. Sie erstreckt sich von Aminosäure 113 bis 280. In der Aminosäuresequenz

der JumonjiC-Domäne befindet sich das konservierte Fe²⁺-Bindemotiv an den Positionen H163-X-D165-X_n-H246, während die Bindung von 2-Oxoglutarat an den Aminosäurepositionen 160 bzw. 184 stattfindet und von einem Threonin (T) und einem Alanin (A) repräsentiert wird (Trewick *et al.*, 2005). Obwohl für über 100 JmjC-Proteine anhand von Homologie-Studien eine Einteilung in acht Gruppen erfolgte, wies CbfA keine Homologie zu den untersuchten Proteinen auf und wurde als alleiniges Mitglied der „Orphan“-Gruppe zugeordnet (Clissold & Ponting, 2001). Aufgrund der vorhandenen Bindestellen für zweiwertiges Eisen und 2-Oxoglutarat kann jedoch für die JmjC-Domäne von CbfA ebenfalls eine 2-OG abhängige Dioxygenase-Funktion vermutet werden.

Auf die JmjC-Domäne folgen zwei Zinkfinger-Motive (ZF). Zinkfinger sind Proteindomänen, die durch Komplexierung von ein oder zwei Zinkionen (Zn²⁺) die Struktur einer fingerförmigen Schleife stabilisieren (Pascual *et al.*, 2000). In einem Protein können bis zu 40 ZF-Domänen in Gruppen oder Clustern angeordnet sein. Der am häufigsten vorkommende Typ besitzt zwei zentrale Cystein- und zwei Histidinmoleküle (C2H2) (Brayer & Segal, 2008). Ursprünglich sind Zinkfinger als DNA-Bindemotive identifiziert worden (Miller *et al.*, 1985). Im Laufe der Zeit konnten jedoch auch weitere Interaktionen von Zinkfingern mit RNA, anderen Proteinen und Lipiden nachgewiesen werden. Zinkfingerproteine sind in vielen zellulären Prozessen involviert, wie beispielsweise der Replikation und DNA-Reparatur, der Translation und dem programmierten Zelltod (Krishna *et al.*, 2003). Der erste Zinkfinger von CbfA wird von den Aminosäuren 373 bis 414 gebildet und besitzt acht Cysteine und drei Histidine (CXHCX₇CXHCX₂CX₁₀CX₂CX₆CX₂H). Welche Aminosäuren genau das ZF-Motiv ausbilden ist unbekannt. Dieses Zinkfingermotiv konnte zu keiner der bisher bekannten 20 Zinkfingertypen zugeordnet werden.

Das zweite Zinkfingermotiv erstreckt sich von Aminosäure 492 bis 550. In diesem Bereich sind 11 Cysteine und ein Histidin zu finden (CHXCX₁₁CX₂CX₄CX₂CX₁₉CXCX₃CXCX₂C), wodurch eine Sequenzähnlichkeit mit mehreren Zinkfingertypen vorhanden ist, u. a. zum PHD-Typ (*Plant Homeo Domain*) oder RING-Typ. Der PHD-Typ tritt bei einigen kernständigen Proteinen auf, die an der Transkriptionsregulation über Chromatinmodifikationen beteiligt sind (Aasland *et al.*, 1995; Bienz, 2006). Innerhalb dieses zweiten ZF-Motivs wird zusätzlich eines der beiden putativen bipartiten Kernlokalisierungssignale von CbfA codiert (K₄₈₈KIKCHRCEKRFKKF₅₀₂), welche für die Funktion als Transkriptionsfaktor vermutlich essentiell sind.

Ein Asparagin-reichen Bereich (NRD) grenzt den N-Terminus von der Carboxy-Terminalen Domäne (CTD) ab (Abbildung 9). Diese Poly-N-Domäne erstreckt sich von

Aminosäure 574 bis 769 und beinhaltet 104 Asparagine, die in drei fast ausschließlich homopolymere Bereiche aufgeteilt sind. Unterbrochen werden sie von zwei Serin-reichen Sequenzabschnitten. Die genaue Funktion dieser Domäne ist noch unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass sie als beweglicher Abstandhalter zwischen den Zinkfingermotiven und der CTD agieren könnte (Horn *et al.*, 1999).

Die Carboxy-terminale Domäne beginnt mit Aminosäure 770 und schließt direkt an die Asparagin-reiche Domäne an. Sie ist eine eigenständige, genregulatorische Einheit, die neben der CbfA-abhängigen TRE5-A-Expression auch für die Expressionsregulation wichtiger Gene zuständig ist (Lucas *et al.*, 2009). Die Bindung der CTD an TRE5-A wird *in vitro* durch zwei AT-reiche Sequenz-Motive des C-Moduls vermittelt, der CMBS-1 und CMBS-2. Der Hauptanteil der etwa 36 bp langen Sequenzbereiche besteht aus 24 bp-langen oligo(dT)-Abschnitten (Geier *et al.*, 1996).

Eine strukturelle und funktionelle Besonderheit erhält die CTD durch die Ausprägung eines sogenannten AT-Haken-Motivs, welches eine Ähnlichkeit zu der AT-Haken-Klasse III zeigt (Aravind & Landsmann, 1998). Dieses Motiv beinhaltet die drei zentralen Aminosäuren Glycin, Arginin und Prolin (GRP), wobei das Arginin an Position 812 für die Bindung der CTD *in vitro* an die kleine Furche der DNA essentiell und *in vivo* an der genregulatorischen Aktivität der CTD beteiligt ist (Horn *et al.*, 1999; Lucas *et al.*, 2009). AT-Haken-Motive sind erstmals anhand von *Non-Histone Chromatin*-Proteinen der *High Mobility Group* (HMG) untersucht worden (Johnson *et al.*, 1988; Monfioletti *et al.*, 1991). Hier vermitteln sie über die DNA-Bindung eine Anordnung von Nucleoprotein-DNA-Komplexen für die Transkription (Reeves, 2001; Reeves & Beckerbauer, 2001).

Innerhalb der CTD ist auch das zweite bipartite Kernlokalisierungssignal (KKR₇₉₉RPIVLDNDKPKGR₈₁₂) vorhanden, welches mit dem AT-Haken-Motiv überlappt (Lucas *et al.*, 2009). Die carboxy-terminale Domäne weist in ihrer Aminosäuresequenz bisher keine signifikante Homologie zu anderen Proteinen außerhalb der Dictyosteliden auf. Für sie ist keine Übereinstimmung mit dem C-Terminus anderer Proteine weiterer Dictyostelia-Gattungen oder eine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Proteinen anderer Organismen gefunden worden.

1.10 Vorangegangene Arbeiten zur Funktion von CbfA

Der C-Modul-bindende Faktor A ist ein kernständiges Protein, das erstmalig im Zusammenhang mit dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A beschrieben wurde. In der Arbeit von Geier *et al.* (1996) konnte durch EMSA-Experimente (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) und *Footprinting*-Analysen gezeigt werden, dass CbfA sequenzspezifisch das 3'-Ende

genomischer Kopien des Retrotransposons erkennt. Auf Proteinebene wird die Interaktion von CbfA mit dem transposablen Element durch den „AT-Haken“ der C-terminalen Domäne vermittelt (Horn *et al.*, 1999). Dabei bindet dieses GR₈₁₂P-Motiv das am 3'-Ende von TRE5-A vorkommende C-Modul. Die Interaktion findet durch die hohe Affinität des AT-Hakens zu oligo(dA)·oligo(dT)-Bereichen statt, die für zwei Bindestellen im C-Modul charakteristisch sind.

Nähere Untersuchungen zur physiologischen Funktion von CbfA setzen *Knock-out*-Mutanten des entsprechenden Proteins voraus. Der Versuch, das *cbfA*-Gen durch homologe Rekombination mittels einer Blasticidin-Resistenz-Kassette zu ersetzen, führte nicht zum erwünschten Erfolg, da dieser *cbfA*-Null-Phänotyp vermutlich letal gewesen ist.

In einem weiteren Versuch wurde mit Hilfe einer Translationssuppression eine Unterexpression des *cbfA*-Genes hervorgerufen (Winckler *et al.*, 2001). Durch die Einführung eines *amber*-Translationsstop-Codons am Triplet der Aminosäure 453 wird eine verkürzte Proteinvariante exprimiert, die wahrscheinlich funktionell inaktiv ist. Das CbfA-Derivat besteht somit aus 452 Aminosäuren und stellt nur etwa die Hälfte des Wildtypproteins dar.

Die als JH.D bezeichnete Suppressionsmutante besitzt lediglich ein CbfA-Level des Volllängenproteins von weniger als 5 % und kann somit für CbfA-vermittelte Expressionsanalysen verwendet werden (Winckler *et al.*, 2001). Der Phänotyp von JH.D zeigt im Vergleich zu dem Wildtypstamm AX2 in axenischer Schüttelkultur sowie auf einem konfluierten Bakterienrasen ein verlangsamtes Wachstum. Anhand von Untersuchungen der Endozytose kann für die Mutante ein stark gestörter Prozess erkannt werden. Zum einen ist die Phagozytoserate der JH.D-Zellen vermindert, womit die verringerte Wachstumsgeschwindigkeit erklärt werden kann, zum anderen ist ein vergrößertes Zellvolumen durch erhöhte Flüssigkeitsaufnahme zu beobachten, da die Pinozytose gesteigert ist (Winckler *et al.*, 2001). Vermutlich sind die Veränderungen in der Nahrungsaufnahme auf eine verringerte Expression und der damit fehlenden Funktion von CbfA als Transkriptionsregulator zurückzuführen.

JH.D besitzt im Vergleich zu AX2 einen auffallenden Aggregationsdefekt (Winckler *et al.*, 2004). Dieser konnte auf die fehlende Aktivierung der Adenylzyklase und der damit im direkten Zusammenhang stehende Bildung des cAMP-Pulses zurückgeführt werden.

Um die Transkriptionsstärke des TRE5-A-Elementes in Abhängigkeit zur CbfA-Expression zu untersuchen, sind im Wildtypstamm AX2 und der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D *Northern-Blot*-Analysen durchgeführt worden (Beck, 2002).

Einleitung

Dabei wurde erkannt, dass im Vergleich von JH.D zu AX2 die RNA-Menge von TRE5-A sowohl des Sense- als auch des Antisense-Stranges verringert ist (Abbildung 10A). Durch den geringen Expressionslevel von CbfA in JH.D ist eine verminderte Transkription des Transposons zu erkennen (Beck, 2002). Die Behandlung von Zellen mit Antimycin A, einem Atmungsketten-Inhibitor, verbesserte die Stabilität der mRNA und damit der Detektion im *Northern-Blot*, verstärkte jedoch nicht die Transkriptionsrate (Schumann *et al.*, 1994). Aufgrund dieser Ergebnisse besteht die Annahme, dass die Transposonaktivität von TRE5-A über die Minus-Strang-RNA-Synthese reguliert werden könnte.

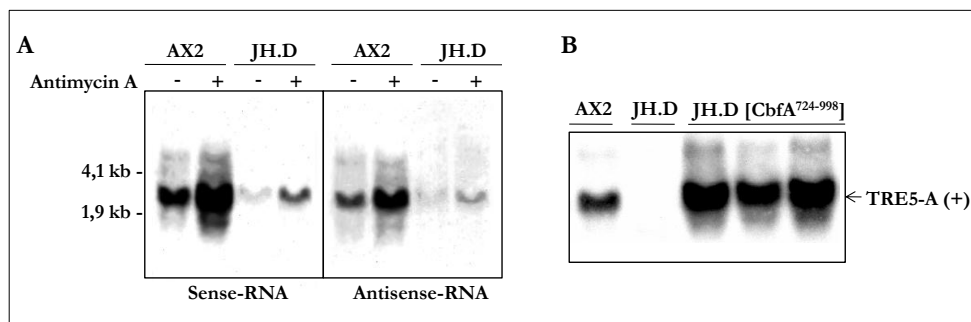


Abbildung 10: *Northern-Blot*-Analysen zur Untersuchung der TRE5-A-Transkriptionsstärke in Abhängigkeit zur Expression des Volllängenproteins von CbfA (A) und des Derivates CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ (B). Abbildung aus Beck (2002) und Jennes (2006).

Mit weiteren *Northern-Blot*-Analysen sollte geklärt werden, welcher funktionelle Bereich von CbfA die TRE5-A-Transkription beeinflusst. Insbesondere der C-Terminus, der das AT-Haken-Motiv beinhaltet, stand dabei im Fokus der Untersuchung. Für die Darstellung der Expressionsregulation durch die C-terminale Domäne ist der Stamm JH.D [CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸] erstellt worden, der ein CbfA-Derivat von Aminosäure 724 bis 998 exprimiert (Beck, 2002). Diese in Abhängigkeit des CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸-Proteins untersuchten Transkriptionsanalysen von TRE5-A lassen im *Northern-Blot* erkennen, dass der C-Terminus von CbfA allein in der Lage ist, den RNA-Level von TRE5-A im Vergleich zu Gesamt-CbfA in AX2 wieder herzustellen (Abbildung 10B; Jennes, 2006).

Da die JH.D-Mutante einen abgewandelten Phänotyp in der vegetativen Wachstumsphase sowie einen Aggregationsdefekt in der multizellulären Entwicklung zeigte, sind neben der TRE5-A-Expression auch Genexpressionsstudien durchgeführt worden. In der Arbeit von Lucas *et al.* (2009) konnte der positive Einfluss von CbfA u. a. auf die Expression von Genen für die Aufnahme und Verdauung von Bakterien erkannt werden, womit die verminderte Phagozytoserate in CbfA-supprimierten Zellen erklärt wurde. Gleichzeitig war eine negative Genregulation durch den Transkriptionsregulator für einige Gene des Aminosäure- und Nukleotidstoffwechsels zu beobachten. Insgesamt konnten in einem cDNA-*Microarray*-Experiment 162 Gene identifiziert werden, die während des vegetativen

Wachstums durch CbfA differenziell exprimiert wurden. Von den ca. 6.000 untersuchten Gentranskripten wurden 80 positiv und 82 negativ durch CbfA reguliert.

Nicht nur in der vegetativen Wachstumsphase sondern auch bei der Induktion der Entwicklungsphase reguliert CbfA die Expression relevanter Gene. Durch *Northern-Blot*-Analysen und einem *DNA-Microarray*-Experiment konnte gezeigt werden, dass entwicklungsrelevante Gene in JH.D nicht exprimiert werden. Insbesondere das Adenylylzyklase codierende Gen *acaA* war in diesen Zellen nicht aktiviert (Abbildung 11; Winckler *et al.*, 2004; Siol *et al.*, 2006a).

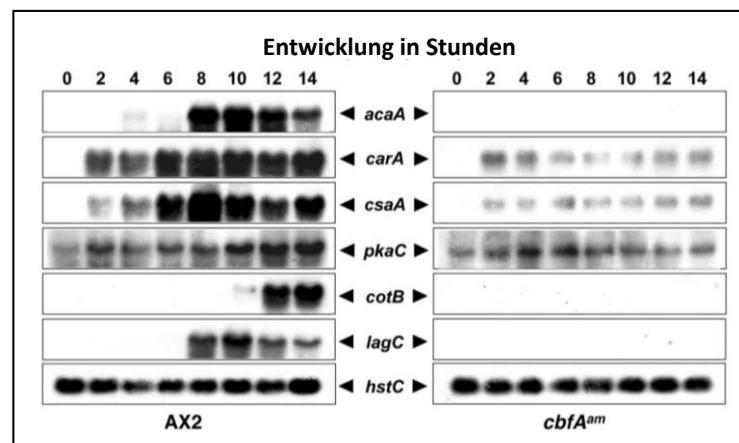


Abbildung 11: Northern-Blot-Analyse der Expression entwicklungsrelevanter Gene im Vergleich von AX2 und JH.D. Alle zwei Stunden wurde jeweils eine Zellprobe zur RNA-Extraktion für die *Northern-Blot*-Analyse verwendet. Abbildung aus Winckler *et al.* (2004).

Dass CbfA vermutlich die *acaA*-Expression beeinflusst, wurde durch Untersuchungen der Bindung von CbfA an den *acaA*-Promotor *in vitro* untermauert (Siol *et al.*, 2006a). Der Transkriptionsregulator interagiert mit einem AT-reichen Bereich im *acaA*-Promotor, der Ähnlichkeit zu den zentralen oligo(dT)-Strängen im C-Modul von TRE5-A zeigte.

1.11 Weitere JmjC-Proteine aus *Dictyostelium discoideum*

Im Genom von *D. discoideum* ist eine paraloge Gensequenz zum *cbfA*-Gen vorhanden. Dieses Gen wurde aufgrund seiner Sequenzverwandtschaft als *cbfB* bezeichnet und codiert für das CbfA-ähnliche Protein CbfB. Sequenzähnlichkeiten sind in der JmjC-Domäne, den Zinkfingermotiven und durch das Vorhandensein einer Poly-N-Domäne gegeben. Hingegen ist die CTD von CbfB verlängert und verweist auf keine Analogie zur CTD von CbfA. Die Funktion von CbfB ist bislang unbekannt.

Anhand einer genomweiten *Blastp*-Analyse wurden neben CbfA und CbfB 11 weitere Proteine von *D. discoideum* identifiziert, die eine JmjC-Domäne besitzen (Abbildung 12).

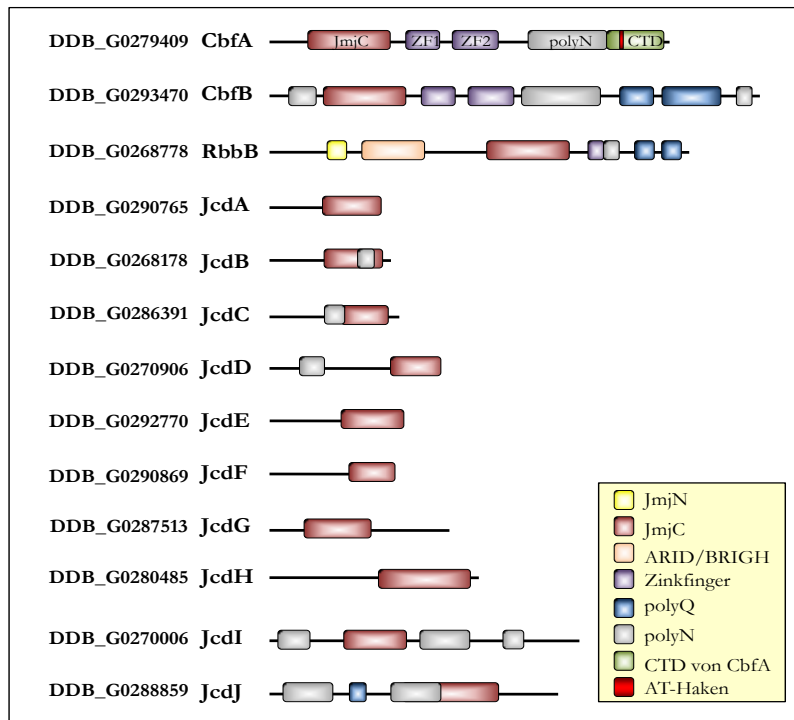


Abbildung 12: Schematische Darstellung aller JmjC-Proteine aus *D. discoideum*.

Während CbfA, dessen paralogen Protein CbfB und RbbB, neben der JmjC-Domäne weitere funktionelle Domänen besitzen, weisen alle anderen Proteine nur eine JmjC-Domäne bzw. Asparagin- oder Glutamin-reiche Sequenzbereiche auf. Für das Protein RbbB (DDB_G0268778) konnte eine Homologie zum humanen RBP2, dem *Retinoblastoma Binding Protein 2*, das eine Demethylase des Lysins an Position 4 von Histon H3 darstellt, erkannt werden (Lopez-Bigas *et al.*, 2008).

Dahingegen scheint das Protein JcdD (DDB_G0270906) aus *D. discoideum* ortholog zum humanen JMJD5 (KDM8) zu sein. JMJD5 besitzt nur eine JmjC-Domäne, wodurch es zur Gruppe der *JmjC-domain-only*-Proteine gezählt wurde (Klose *et al.*, 2006). Erst vor kurzem wurde für JMJD5 eine Demethylasefunktion am Histon H3 für das Lysin an Position 36 beschrieben, womit es als epigenetischer Regulator aktiv sein könnte (Hsia *et al.*, 2010).

Eine Homologie des JmjC-Proteins JcdG (DDB_G0287513) von *D. discoideum* konnte zu dem humanen NO66 festgestellt werden. NO66 wurde in der Arbeit von Sinha *et al.* (2010) als Histon-Demethylase für H3K4me und H3K36me identifiziert. Da dieses Protein nur eine JmjC-Domäne als funktionelle Einheit besaß, wurde es ebenfalls in die Gruppe der *JmjC-domain-only*-Proteine eingeordnet (Klose *et al.*, 2006b).

Eine Sequenzähnlichkeit für JcdI (DDB_G0270006) aus *D. discoideum* ist zum humanen JMJD6-Protein vorhanden. Das humane JMJD6 ist die einzige, bisher identifizierte Arginin-Demethylase. Dieses JmjC-Protein ist eine Fe^{2+} und 2-OG-abhängige Dioxygenase, die Arginin an Position 2 von Histon H3 und an Position 3 von Histone H4

demethyliert (Chang *et al.*, 2007). JMJD6, auch bekannt als PTDSR, wurde in der Gruppe der *JmjC-domain-only*-Proteine eingeordnet (Klose *et al.*, 2006b). Die Funktionen der JmjC-Proteine aus *D. discoideum* sind jedoch außer für CbfA nicht bekannt

1.12 Zielstellung

Das Multidomänenprotein CbfA aus *Dictyostelium discoideum* ist ein Transkriptionsregulator, der die Expression des Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A beeinflusst und die Transkription relevanter Gene des vegetativen Wachstums und der multizellulären Entwicklung reguliert (Winckler *et al.*, 2004; Lucas *et al.*, 2009). Es wurde bereits gezeigt, dass CbfA sowohl mit TRE5-A als auch mit dem Promotor des für die Entwicklung bedeutsamen Genes der Adenylzyklase *in vitro* eine DNA-Protein-Bindung über oligo (dT)-Bereiche eingeht (Horn *et al.*, 1999; Siol *et al.*, 2006a).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Regulation der Expression von TRE5-A und ggf. weiterer Retrotransposons in Abhängigkeit von CbfA detaillierter zu untersuchen. Da die Transkription transposabler Elemente durch epigenetische Kontrolle negativ beeinflusst werden kann und CbfA einen putativen Chromatin-„Remodeller“ darstellt, soll insbesondere eine Regulation durch epigenetische Mechanismen in die Überlegungen mit einbezogen werden.

Neben der TRE5-A-Expression beeinflusst CbfA ebenfalls die Expression spezifischer Gene der multizellulären Entwicklung (Winckler *et al.*, 2004). Da eine Interaktion von CbfA mit dem Promotorbereich des *acaA*-Genes bereits *in vitro* beobachtet wurde (Siol *et al.*, 2006a), soll im Weiteren die Relevanz der Bindung von CbfA an regulatorische Sequenzen *in vivo* untersucht werden. Durch die gezielte funktionelle Inaktivierung verschiedener Proteindomänen von CbfA sollen Erkenntnisse zur Bedeutung dieser Domänen hinsichtlich der genregulatorischen Funktion von CbfA erhalten werden.

Im weiteren Verlauf wird ein besonderes Augenmerk auf die Funktion der JmjC-Domäne von CbfA gelegt. JmjC-Domänen sind bereits in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert worden und dienen dort als Histon-Demethylasen. Um erste Erkenntnisse für die JmjC-Domäne von CbfA im Zusammenhang mit einer demethylierenden Funktion zu erhalten, werden Histonmodifikationen des Lysins an Position 4 und 9 des Histons H3 in Abhängigkeit von CbfA *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dabei soll auch der Versuch unternommen werden, die JmjC-Domäne von CbfA zu kristallisieren. Abschließend sollen mit der JumonjiC-Domäne von CbfA-Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt werden, da JmjC-Proteine meist innerhalb von größeren Proteinkomplexen agieren können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte, Chemikalien und deren Bezugsquellen

<u>Laborgerät</u>	<u>Bezeichnung/Hersteller</u>
Blockthermostate	Combi-Therm CH100 (Peqlab) HeizThermoMixer MHR 11 (HLC BioTech)
Blotgeräte	PerfectBlue Semi-Dry Elektrobloetter SEDEK M (Peqlab) X Cell Blot Modul (Invitrogen)
Elektroporator	Gene Pulser Xcell (Bio-Rad)
Evaporator	VacuFuge™ Concentrator 5301 (Eppendorf)
Geldokumentation	Gel Jet Imager 2004 (Intas)
Gelelektrophoresen	PerfectBlue Gelsystem Mini (Peqlab) PerfectBlue Doppelgelsystem Twin M und L (Peqlab) Minigel-Twin (Biometra)
Getrocknung	Gel Dryer Model 543 (Bio-Rad)
Inkubatoren	Brutschrank: TS606-G/4-i (WTW) B20 (Heraeus) Schüttler: Multitron 2 (HT-Infors)
Mikroskope	Mikroskop CKX 41 (Olympus) Kamera Evolution™ MP COLOR (MediaCybernetics) Fluoreszenz-Mikroskop DM IRB (Leica) Kamera DC 350 (Leica) Stereomikroskop SZX9 (Olympus)
pH Meter	pH Meter pH 526 MultiCal® (WTW)
Real-time-Thermocycler	Mx3000P QPCR System (Stratagene)
Sonicator	Labsonic U (B.Braun Biotech Int.)
Sterilisatoren	Variklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik) Hiclave™ HV-85L (HMC)
Thermocycler	Primus 96 advanced (Peqlab)
UV/VIS-Spektrometer	BioPhotometer (Eppendorf)
Vortex	VF2 (Janke & Kunkel, IKA Labortechnik)

Waagen	Acculab Vic612 (Sartorius) MC1 (Sartorius)
Zentrifugen	J2-MC (Beckmann) Centrifuge 5415 D (Eppendorf) Centrifuge 5810R (Eppendorf) Labofuge 400R (Heraeus) Multifuge 1L L-R (Heraeus) Megafuge 1.0R (Heraeus)

Die verwendeten Chemikalien dieser Arbeit wiesen in ihrer Qualität den Reinheitsgrad „pro analysis“ auf. Sie wurden von folgenden Firmen bezogen: BD Biosciences, BDH Prolabo, Fluka, Invitrogen, Merck, Carl-Roth, Serva, Sigma-Aldrich. Substanzen, die für die Versuche von besonderer Wichtigkeit waren oder zusätzlich zur Standard-Laboraausstattung verwendet wurden, sind nachfolgend aufgelistet.

Chemikalien	Hersteller/Lieferant
Adenin: Adenine hemisulfat salt	Sigma-Aldrich
AEBSF hydrochloride	Molekula
Aprotinin	Carl-Roth
Dynabeads [®] M-280 Streptavidin	Invitrogen
FM Minimal Medium	ForMedium
Hefeminimalmedium: Minimal SD Base	Clontech
Hefe-Dropout: Leu ⁻ DO Supplement	Clontech
Hefe-Dropout: Trp ⁻ DO Supplement	Clontech
Hefe-Dropout: Leu ⁻ /Trp ⁻ DO Supplement	Clontech
Hefe-Dropout: Leu ⁻ /Trp ⁻ /His ⁻ DO Supplement	Clontech
Hefe-Dropout: Ade ⁻ /Leu ⁻ /Trp ⁻ /His ⁻ DO Supplement	Clontech
HL5 Medium	ForMedium
IgG-Agarose	Sigma-Aldrich
Leupeptin Hemisulfat	Carl-Roth
L-[³⁵ S]-Methionin	Hartmann Analytic
Ni ²⁺ -NTA Agarose	Qiagen
Proteaseinhibitoren: Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche

Material und Methoden

Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose	Millipore
Ultrogel A4	Sigma-Aldrich
X- α -Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- α -D-galactopyranosid	Clontech
X- β -Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid	Carl-Roth

2.1.2 Allgemeine Lösungen und Puffer

In der nachfolgenden Liste werden Standardpuffer und allgemeine Lösungen aufgezählt. Besondere Lösungen und Puffer sind bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS)	30 % (<i>w/v</i>) in MQ-Wasser
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl (pH 10,4); 20 % (<i>v/v</i>) Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl (pH 10,4); 20 % (<i>v/v</i>) Methanol
Auftragspuffer (10 x)	0,2 % (<i>w/v</i>) Orange G; 0,1 % (<i>w/v</i>) Xylencyanol; 200 mM EDTA; 50 % (<i>v/v</i>) Glycerin; 20 mM Tris; pH 7,6
Coomassie-Färber	0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250; 45 % (<i>v/v</i>) Methanol; 10 % (<i>v/v</i>) Essigsäure in 200 ml MQ-Wasser
1 M DTT	3,09 g DTT in 20 ml MQ-Wasser
0,5 M EDTA	93,06 g EDTA in 500 ml MQ-Wasser; pH 8,0
E-Puffer	10 mM KH ₂ PO ₄ ; 50mM Sucrose; pH 6,1
2 M Glycin	15,01 g in 100 ml MQ-Wasser
1 M HEPES	47,72 g in 200 ml MQ-Wasser
0,1 M IPTG	24 mg/ml in MQ-Wasser
Kathodenpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 9,4); 40 mM 6-Amino-hexansäure; 20 % (<i>v/v</i>) Methanol
9 M LiCl	76,32 g in 200 ml MQ-Wasser
Low TE	10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
PBS (10 x)	40,9 g NaCl; 1 g KCl; 8,9 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 1,2 g KH ₂ PO ₄ in 500 ml MQ-Wasser; pH 7,4
Phosphatpuffer (50 x)	735 mM KH ₂ PO ₄ ; 100 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O

Proteingelentfärbelösung	10 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure
RNase A-Lösung	1 mg/ml in MQ-Wasser
SDS-Laufpuffer (10 x)	60,4 g Tris; 288 g Glycin; 20 g SDS in 2 l MQ-Wasser
TBE (10 x)	108 g Tris; 55 g Borsäure; 9,3 g EDTA in 1 l MQ-Wasser
TBS (10 x)	30,29 g Tris; 43,83 g NaCl in 500 ml MQ-Wasser; pH 7,5
TBS-T	1 x TBS; 0,05 % TWEEN-20
Transferpuffer	2,5 g Tris; 14,5 g Glycin; 200 ml Methanol in 1 l MQ-Wasser
X-β-Gal	10 mg/ml in DMF

2.1.3 Nährmedien, Antibiotika und Additive

<u>Nährmedium</u>	<u>Zusammensetzung</u>	
FM Minimal (ForMedium™)	19,3 g/l ForMedium™ FM Minimal Medium	
HL5 (ForMedium™)	22 g/l ForMedium™ HL5 Medium nach Autoklavieren 25 ml/l 40 % (w/v) Glucose	
Luria Broth (LB)	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl (15 g/l Agar); pH 7,0	
MES	10 g/l Bacto-Pepton; 5 g/l Hefeextrakt; 1,3 g/l 1,3 g/l MES; pH 7,1 nach Autoklavieren: 25 ml/l 40 % (w/v) Glucose	
SD	26,7 g/l SD-Base; Dropout, je nach Selektion; (18 g/l Agar); pH 5,8	
SOC	20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Glucose	
YPDA	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Pepton; 20 g/l Glukose; (18 g/l Agar); pH 6,5; nach dem Autoklavieren 15 ml/l 0,2 % (w/v) Adeninhemi- sulfat	
<u>Antibiotikum/Additivum</u>	<u>Stammlösung</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin (<i>E. coli</i>)	100 mg/ml in 50%igem Ethanol	100 µg/ml
Blasticidin S (<i>D. discoideum</i>)	4 mg/ml in MQ-Wasser	5 µg/ml
Chloramphenicol (<i>E. coli</i>)	20 mg/ml in 50%igem Ethanol	34 µg/ml

Material und Methoden

G418 (<i>D. discoideum</i>)	4 mg/ml in MQ-Wasser	5-10 µg/ml
Gentamycin (<i>E. coli</i>)	20 mg/ml in MQ-Wasser	20 µg/ml
Kanamycin (<i>E. coli</i>)	50 mg/ml in MQ-Wasser	30-50 µg/ml
(<i>S. cerevisiae</i>)	50 mg/ml in MQ-Wasser	50 µg/ml
Uracil (<i>D. discoideum</i>)	2 mg/ml in MQ-Wasser	20 µg/ml

2.1.4 Oligonukleotide, Plasmide und Vektoren

Die verwendeten Oligonukleotide, Plasmide und Vektorsysteme sind tabellarisch im Anhang aufgeführt. Alle Oligonukleotide wurden von Metabion International AG (Martinsried) oder MWG (Ebersberg) synthetisiert.

2.1.5 Kits und Enzyme

Kit	Hersteller/Lieferant
Amersham ECL Plus TM Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
EvaGreen TM Fluorescent DNA Stain	Jena Bioscience
Matchmaker TM Co-IP Kit	Clontech
PCR Extender System	5 Prime
pGEM [®] -T Vector System I	Promega
Qiaquick [®] Gel Extraction Kit	Qiagen
Qiaquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
Omniscript [®] Reverse Transcription Kit	Qiagen
QuickChange [®] Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen
Taq DNA Polymerase	5 Prime
TNT [®] -T7 Coupled Reticulocyte Lysate System	Promega

Enzym	Hersteller/Lieferant
Alkalische Phosphatase (CIP), 10 U/µl	New England Biolabs
Lysozym, 20.000 U/mg	Carl-Roth
Proteinase K, 900 U/µl	Fermentas
Restriktionsendonukleasen, 4-100 U/µl	New England Biolabs

Ribonuklease A 90 U/mg	Carl-Roth
T4 DNA Ligase, 400 U/ μ l	Invitrogen
T4 Polynukleotidkinase, 10 U/ μ l	New England Biolabs
T7 DNA Polymerase, unmodified, 10 U/ μ l	New England Biolabs

2.1.6 Antikörper

Name	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Cbfa (7F3)	Überstand WB: 1:1 in 3 % (<i>w/v</i>) BSA in TBS-T	monoklonaler, primärer Antikörper aus Hybridomazellen (Winckler <i>et al.</i> 2001) gegen den C-Terminus von Cbfa (AS 795-998)
Anti-Cbfa (3H7)	Überstand WB: 1:1 in 3 % (<i>w/v</i>) BSA in TBS-T	monoklonaler, primärer Antikörper aus Hybridomazellen (Lucas <i>et al.</i> , 2009) gegen den N-Terminus von Cbfa (AS 78-355)
Anti-Histon H3 (ab1791)	WB: 1:5000	polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen den C-Terminus von Histon H3 (Abcam)
Anti-Histon H3 K4me2 (1347-1)	ChIP: 1:500 IF: 1:500	monoklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen das dimethylierte Lysin 4 von Histon H3 (Epitomics)
Anti-Histon H3 K4me3 (ab8580)	ChIP: 1:500 IF: 1:500	polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen das trimethylierte Lysin 4 von Histon H3 (Abcam)
Anti-Histon H3 K9me2 (07-441)	IF: 1:200	polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen das dimethylierte Lysin 9 von Histon H3 (Upstate)
Anti-Histon H3 K9me3 (07-523)	ChIP: 1:500 IF: 1:1000	Antiserum vom Kaninchen gegen das trimethylierte Lysin 9 von Histon H3 (Upstate)
Anti-Histon H3 K9me3 (ab1186)	ChIP: 1:500 WB: 1:2500	polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen das trimethylierte Lysin 9 der H3-Sequenz (QTARKST) (Abcam)
Anti-GFP (2555)	WB: 1:1000	polyklonaler, primärer Antikörper aus dem Kaninchen gegen das GFP getaggte Protein (Cell Signaling Technology)

Material und Methoden

Anti-Maus-IgG HRP-linked antibody (7076)	WB: 1:2000	HRP-gekoppelter, sekundärer Antikörper aus dem Pferd (Cell Signaling Technology)
Anti-Kaninchen-IgG HRP-linked antibody (7074)	WB: 1:2000	HRP-gekoppelter, sekundärer Antikörper aus der Ziege (Cell Signaling Technology)
Anti-Kaninchen-IgG Cy3-linked antibody	IF: 1:500	Indocarbocyanin-gekoppelter, sekund. Antikörper aus der Ziege (Dianova)

2.1.7 Mikroorganismen

Escherichia coli-Stämme (*E. coli* K12)

Bezeichnung	Genotyp
ArcticExpress™	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] (Stratagene)
ArcticExpress™ (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] (Stratagene)
ArcticExpress™ RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] [<i>argU ileY leuW</i> Str ^r] (Stratagene)
ArcticExpress™ (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>cpn10 cpn60</i> Gent ^r] [<i>argU ileY leuW</i> Str ^r] (Stratagene)
BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i>
BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm</i> <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> λ(DE3)
BL21 CodonPlus RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r] (Stratagene)
BL21 CodonPlus (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r] (Stratagene)
DH5α	<i>E. coli</i> F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk ⁻ , mk ⁺) <i>phoA supE44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1</i> λ ⁻
Rosetta™ (DE3)	<i>E. coli</i> F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r_B⁻m_B⁻</i>) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^r) (Novagene)
RZ1032	<i>E. coli</i> F ⁻ <i>cat</i> (pCJ105 m13s Cam ^r) <i>dut1 ung1 thi-1</i> <i>relA1 spoT1, mcrA</i>

Saccharomyces cerevisiae-Stämme

Bezeichnung	Genotyp
AH109	<i>MATa</i> , <i>trp1</i> -901, <i>leu2</i> -3, 112, <i>ura3</i> -52, <i>bis3</i> -200, <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , <i>LYS2</i> :: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>HIS3</i> , <i>MEL1</i> , <i>GAL2</i> _{UAS} - <i>GAL2</i> _{TATA} - <i>ADE2</i> , <i>URA3</i> :: <i>MEL1</i> _{UAS} - <i>MEL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i> (Clontech)
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3</i> -52, <i>bis3</i> -200, <i>ade2</i> -101, <i>trp1</i> -901, <i>leu2</i> -3, 112, <i>gal4</i> Δ , <i>mef</i> ⁻ <i>gal80</i> Δ , <i>URA3</i> :: <i>GAL1</i> _{UAS} - <i>GAL1</i> _{TATA} - <i>lacZ</i> , <i>MEL1</i> (Clontech)

Dictyostelium discoideum-Stämme

Bezeichnung	Beschreibung
AX2	Aus dem Wildtyp NC4 (Raper, 1935) hervorgegangener, axenisch wachsender Laborstamm von <i>D. discoideum</i> (Sussmann & Sussmann 1967), der Plasmide ins Genom integriert (<i>Dicty Stock Center</i>); <i>axeA</i> , <i>axeB</i> , <i>axeC</i>
JH.D	AX2-Mutante, die aufgrund eines <i>amber</i> -Stopcodons im <i>cbfA</i> -Gen das Volllängenprotein auf ca. 5 % supprimiert (Winckler <i>et al.</i> , 2001); <i>axeA</i> , <i>axeB</i> , <i>axeC</i> , pJH1.2(am)-tetO:Glu(su)
JH.D(ura ⁻)	JH.D-Mutante, die neben der Suppression von CbfA eine Deletion des UMPS-Genes durch homologe Rekombination erfahren hat und dadurch einen <i>ura</i> ⁻ Phänotyp aufweist; <i>axeA</i> , <i>axeB</i> , <i>axeC</i> , <i>pyr5</i> -6, pJH1.2(am)-tetO:Glu(su)
RrpA ⁻	Aus dem Stamm AX2-214 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>rrpA</i> (Martens <i>et al.</i> , 2001)
RrpB ⁻	Aus dem Stamm AX2-214 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>rrpB</i> (Martens <i>et al.</i> , 2001)
RrpC ⁻	Aus dem Stamm AX2-214 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>rrpC</i> (Martens <i>et al.</i> , 2001)
HelF ⁻	Aus dem Stamm AX2-214 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>helF</i> (Popova <i>et al.</i> , 2006)
DnmA ⁻	Aus dem Stamm AX2-214 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>dnmA</i> (Kuhlmann <i>et al.</i> , 2005)
Set1 ⁻	Aus dem Stamm AX2 hergestellter <i>Knock-out</i> -Stamm für das Gen <i>set1</i> (Chubb <i>et al.</i> , 2006)

2.2 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardmethoden, wie beispielsweise Restriktion, elektrophoretische Trennung, Aufreinigung, Fällung und Ligation der DNA sowie Klonierungstechniken wurden in Ausubel *et al.* (1999) und Sambrook & Russell (2001) ausführlich beschrieben und daher in dieser Arbeit nicht näher erläutert.

2.2.1 Zielgerichtete *in vitro*-Mutagenese

5 x Annealing-Puffer:	200 mM Tris-HCl pH 8,0 250 mM NaCl
10 x Elongationspuffer:	100 mM MgCl ₂ 10 mM ATP 10 mM DTT
PEG-Lösung:	20 % (<i>w/v</i>) PEG 6-8000 3,5 M NH ₄ OAc
10 x T4 Polynukleotidkinase-Puffer:	700 mM Tris-HCl pH 7,6 100 mM MgCl ₂ 50 mM DTT

2.2.1.1 Herstellung von Einzelstrang-DNA

Das Plasmid, welches mutiert werden sollte, enthielt zusätzlich zu Standard-plasmidfunktionen einen f1-Ori, der als Replikationsursprung filamentöser Phagen diente. Dieses Phagemid wurde mittels CaCl₂-Transformation in den *E. coli*-Stamm RZ1032 gebracht, der bei 37°C bebrütet wurde. Am folgenden Tag wurde ein Klon in eine Vorkultur von 3 ml LB_{amp} überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Von dieser Vorkultur war eine Hauptkultur, die 50 ml LB_{amp}-Medium enthielt, angeimpft und ebenfalls bei 37°C geschüttelt worden. Hatte die OD₆₀₀ der Kultur einen Wert von 0,3 erreicht, wurden 100 µl einer Helferphagen M13K07-Suspension zu den Zellen gegeben und weitere 60 Minuten bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl Kanamycin (50 mg/ml) waren die Zellen über Nacht bei 200 rpm und 37°C geschüttelt worden. Die Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag für 15 Minuten bei 4°C und 9000 x g zentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wurde in ein neues Falcon überführt. Es folgte eine RNA-Restriktion für 30 Minuten bei Raumtemperatur, indem 50 µl RNase A (1 mg/ml) zu dem Überstand pipettiert wurden. Nach Zugabe von 12,5 ml PEG-Lösung und anschließender Inkubation für 30 Minuten auf Eis wurden die rekombinanten- und Helferphagen gefällt und konnten durch erneutes Zentrifugieren für 15 Minuten bei 9000 x g und 4°C pelletiert werden. Das Pellet war in 800 µl low TE-Puffer gelöst und in ein Reaktionsgefäß, in dem sich 80 µl 4 M NaCl befanden, überführt worden. Die

Einzelstrang-DNA konnte anschließend mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und durch Ethanol gefällt werden. Das getrocknete Pellet wurde in 30 µl low TE-Puffer resuspendiert und die DNA-Konzentration bestimmt.

2.2.1.2 5'-Phosphorylierung der Oligonukleotide

Für die *in vitro*-Mutagenese wurde ein Oligonukleotid, dass die gewünschte Mutationssequenz trug, am 5'-Ende phosphoryliert. Dafür wurde folgender Reaktionsansatz hergestellt.

15 µl MQ-Wasser
2 µl Mutationsprimer (100 pmol/µl)
2 µl Polynukleotidkinasepuffer (10 x)
1 µl ATP (100 mM)
0,5 µl T4 Polynukleotidkinase

Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz zentrifugiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend war eine Ethanol-Fällung durchgeführt, das Pellet in 20 µl MQ-Wasser resuspendiert und bei -20°C gelagert worden.

2.2.1.3 *In vitro*-Mutagenese

Die Hybridisierung des Mutationsprimers an die einzelsträngige DNA erfolgte in einem Reaktionsansatz, der sich wie folgt zusammensetzte.

10 µl MQ-Wasser
4 µl Annealing-Puffer (5 x)
5 µl phosphorylierter Mutationsprimer
1 µg ss-dU-DNA

Nachdem der Ansatz gut vermischt wurde, war dieser für 4 Minuten bei 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt worden. Für die Elongation wurden zu dem Hybridisierungsansatz, dessen Volumen 20 µl betrug, weitere Lösungen und Enzyme pipettiert.

10 µl MQ-Wasser
4 µl Elongationspuffer (10 x)
2 µl dNTPs (25 mM)
1 µl T7 DNA-Polymerase
3 µl T4 DNA-Ligase

Der gesamte Ansatz wurde fünf Minuten auf Eis, fünf Minuten bei Raumtemperatur und weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ethanol-Fällung und die Resuspension des Pellets in 50 µl MQ-Wasser. Verschiedene Verdünnungen (1:20, 1:50) wurden mittels Elektroporation in DH5α-Zellen transformiert, die Plasmid-DNA isoliert und durch DNA-Sequenzierung die Mutation überprüft.

2.2.1.4 Die zielgerichtete Doppel-Strang-Mutagenese

Eine weitere Form der zielgerichteten *in vitro*-Mutagenese wurde mittels des *QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits* durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode lag darin, dass keine einzelsträngige DNA und somit keine Klonierung in einen M13-basierenden Bakteriophagen-Vektor benötigt wurde. Es konnte jede doppelsträngige Plasmid-DNA bis zu einer Größe von acht Kilobasen für eine Mutagenese verwendet werden. Weiterhin waren neben Punktmutationen auch mehrere Basenaustausche und Deletionen bzw. Insertionen möglich. Das Kit wurde nach den Empfehlungen des Herstellers verwendet.

2.2.2 Extraktion von RNA und Synthese von cDNA

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus *D. discoideum* wurde das *RNeasy[®] Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet. Es wurde ein Zellpellet mit 2×10^7 Zellen eingesetzt und entsprechend dem Protokoll „*RNeasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells I, Spin Protocol*“ gearbeitet. Nachdem zweimal mit 50 µl RNase-freien Wasser die RNA von der Säule eluiert wurde, war die Konzentration photometrisch bestimmt worden. Zur Kontrolle vollständiger Restriktion genomischen DNA wurde für jede cDNA-Synthese parallel ein Reaktionsansatz (-RT control) erstellt, dem keine reverse Transkriptase zugeführt wurde.

Die Synthese von cDNA war unter Verwendung des *Omniscript[®] Reverse Transcription Kit* von Qiagen und eines oligo(dT)₁₈ Primers durchgeführt worden. Für jede Reaktion wurden 250 ng/µl RNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde nach Angabe des Herstellers pipettiert, für eine Stunde bei 37°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

2.2.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Um die Expression verschiedener Gene in unterschiedlichen *D. discoideum*-Stämmen zu analysieren, wurde auf die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR zurück gegriffen. Die verwendete *template*-DNA stellte cDNA dar, die aus Gesamt-RNA mittels der reversen Transkription gewonnen wurde. Als Fluoreszenz-Farbstoff diente *EvaGreenTM Fluorescent DNA Stain* (Jena Bioscience). Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25 µl wurde wie folgt zusammengestellt.

- 12,75 µl MQ-Wasser
- 2,5 µl Reaktionspuffer (10 x)
- 2,5 µl dNTP-Mix (2 mM)
- 0,375 µl Rox-Farbstoff (1:500)
- 0,5 µl *EvaGreenTM Fluorescent DNA Stain*
- 1 µl cDNA (1:10)
- 2,8 µl *forward*-Primer
- 2,8 µl *reverse*-Primer
- 0,25 µl *Taq*-Polymerase

Als externen Standard wurde das Haushaltsgen *gpdA* (DDB_G0275153) und *catA* (DDB_G0274595) gewählt, die für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) bzw. für eine Katalase codierten. Für jedes untersuchte Gen wurde ein Reaktionsansatz ohne cDNA als Negativkontrolle (*no template control*) mitgeführt. Ebenso wurde ein Reaktionsansatz (*-RT control*) für jedes Gen erstellt, in dem die eingesetzte Nukleinsäure während der cDNA-Synthese keine reverse Transkriptase erhielt und somit auch keine cDNA sondern RNA darstellte.

Das Temperatur-Zeit-Schema für die Echtzeitquantifizierung sah folgendermaßen aus.

Denaturierung (initial)	95°C	10 min	1 Zyklus
Denaturierung (zyklisch)	95°C	30 sec	} 40 Zyklen
Hybridisierung	60°C	30 sec	
Elongation (zyklisch)	72°C	30 sec	
Denaturierung (terminal)	95°C	1 min	1 Zyklus

Die Messungen für jeden *D. discoideum*-Stamm wurden an mindestens drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Anschließend war die Genregulation aus den C_T -Werten nach der Methode von Pfaffl (2001) berechnet worden. Zusätzlich wurde für den Stamm AX2 die PCR-Effizienz jedes verwendeten Primerpaares bestimmt.

2.2.4 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.2.4.1 Herstellung kompetenter Hefezellen (AH109)

1 M Bicin 16,35 g in 100 ml MQ-Wasser, pH 8,35

Lösung A 500 mM Ethylenglykol
 10 mM Bicin
 1 M Sorbitol

Eine Vorkultur von 10 ml YPDA-Medium wurde mit Zellen des *Saccharomyces cerevisiae*-Stammes AH109 (Clontech) beimpft und über Nacht bei 30°C und 150 *rpm* kultiviert. Von der Vorkultur waren 5 ml in eine Hauptkultur mit 100 ml YPDA-Medium überführt und weitere 3-4 Stunden bei 30°C und 150 *rpm* geschüttelt worden. Hatte die OD_{600} der Zellen einen Wert von 0,5 erreicht, wurden diese auf 50 ml-Volumina aufgeteilt und für fünf Minuten bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in je 10 ml Lösung A resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden kurz getrocknet und konnten in 1 ml Lösung A nochmals vorsichtig gelöst werden. Nach Zugabe von 55 µl DMSO je Pellet waren die Zellen zu 200 µl Aliquots in gekühlte Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gefroren und gelagert worden.

Material und Methoden

2.2.4.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* nach Klebe *et al.* (1983)

Lösung B 400 mM Polyethylenglykol 1000
 200 mM Bicin

Lösung C 150 mM NaCl
 10 mM Bicin

Ein Aliquot kompetenter Hefezellen wurde für fünf Minuten auf Eis angetaut. Für die Transformation waren 2 µg der Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben, sorgfältig gemischt und für weitere fünf Minuten bei 37°C und 700 *rpm* geschüttelt worden. Nach Zugabe von 1 ml Lösung B wurden die Hefezellen 60 Minuten bei nur 30°C und 500 *rpm* inkubiert und anschließend für fünf Minuten bei 800 x g pelletiert. Nach der Resuspension der Zellen in einem Milliliter Lösung C und weiteren Zentrifugieren bei 800 x g wurde der Überstand verworfen, die Zellen auf selektivem Hefemedium ausplattiert und für 3 Tage bei 30°C kultiviert.

2.2.4.3 *Plasmidrescue* - Isolierung von Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Lysispuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 1 mM EDTA
 300 mM NaCl
 1 % (*v/v*) SDS
 2 % (*v/v*) Triton X-100

Drei Milliliter SD-Leu⁻/Trp⁻ Medium wurden mit Zellen einer Kolonie angeimpft und für 36 Stunden bei 30°C und 220 *rpm* kultiviert. Ein Milliliter der Kultur wurde für die Herstellung eines Glycerin-Gefrier-Stocks verwendet, indem 410 µl 86%iges Glycerin zu den Hefen gegeben, diese gut gemischt und bei -80°C eingefroren wurden.

1,5 ml der Kultur waren in besonders abdichtende Reaktionsgefäße überführt und für eine Minute bei 10.000 x g pelletiert worden. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl Lysispuffer und ca. 300 µl Glasperlen resuspendiert, nach Zugabe von 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) für zwei Minuten mechanisch verwirbelt und bei 4°C für fünf Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, weitere 100 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol dazugegeben und 15 Sekunden gemischt und zentrifugiert. Erneut war die plasmidhaltige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol gefällt und mit 70%igem Ethanol mehrmals gewaschen worden. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde nach dem Trocknen in 20 µl MQ-Wasser gelöst. 5-10 µl der DNA wurden mittels Elektroporation in den *Escherichia coli*-Stamm DH5α transformiert. Zum Nachweis der Isolation beider Plasmide wurden 400 µl der transformierten Zellen auf eine LB_{Amp}-Platte (*Prey*-Plasmid) und 600 µl auf eine LB_{Kan}-Platte

(*Bait*-Plasmid) ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert. Im Anschluss erfolgte die Präparation der *Prey*-Plasmid-DNA für fünf Kolonien sowie für eine Kolonie der *Bait*-Plasmid-DNA wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Identifizierung der cDNA-Fragmente erfolgte durch Sequenzierung.

2.2.4.4 Screening von Hefe-2-Hybrid-Banken

10 x YNB-Glucose-Medium: 6,7 g *Yeast Nitrogen Base* (YNB)
20 g Glucose
100 ml MQ-Wasser
X- α -Gal 4 mg/ml in DMF

Das Prinzip des Protein-Protein-Interaktionsassays bestand darin, dass ein *Bait*-Gen, in diesem Fall die JumonjiC-Domäne von CbfA, als Fusionsprotein mit der GAL4-DNA-Bindedomäne exprimiert wurde. Parallel dazu war ein cDNA-Fragment als Fusion mit der GAL4-DNA-Aktivierungsdomäne exprimiert worden. Interagierten *Bait*- und *Prey*-Protein in dem Reporterstamm AH109 miteinander, wurde durch die in Nachbarschaft liegende Binde- und Aktivierungsdomäne der Transkriptionsfaktor aktiviert und somit die Reportergene *ADE2*, *HIS3*, *lacZ* und *MEL1* exprimiert.

Für das Screening in Hefe wurden cDNA-Banken mittels dem *Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit* (Clontech) im Rahmen der Promotionsarbeit von Jörg Lucas konstruiert. Die Identifizierung von Interaktionspartnern beruhte auf dem *Mating* von zwei Hefe-Stämmen, die einen unterschiedlichen *Matingtyp* entsprachen. In den MAT α -Hefestamm AH109 wurde das *Bait*-Plasmid pGBKT7-JmjC131/132, das neben dem CbfA-Derivat (CbfA¹⁵⁻³⁷⁴) auch für die Bindedomäne (GAL4-BD) und den TRP1-Marker codierte, transformiert und die Zellen für drei Tage bei 30°C auf selektivem Medium kultiviert. Ein Klon dieser Transformation wurde in eine 50 ml SD_{Kan}-Trp-Kultur (50 μ g/ml) überführt und 20-24 Stunden bei 30°C und 250 *rpm* geschüttelt. Entsprechend der OD₆₀₀ einem Wert von 0,7, wurde die Kultur für fünf Minuten bei 600 x g sedimentiert. Das Zellepellet wurde in 5 ml Selektionsmedium aufgenommen und mit einem Milliliter des MAT α -Hefestamm Y187 in einer 45 ml 2 x YPDA_{Kan}-Kultur (50 μ g/ml) vereint und für 20-24 bei 30°C und 40 *rpm* geschüttelt. Zellen des Stammes Y187 stellten das *Prey*-Plasmid pGADT7-Rec, welches je ein cDNA-Fragment beinhaltete und für die Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) sowie für den LEU2 Marker codierte, zur Verfügung. Am folgenden Tag wurde die Kultur zu je 25 ml aufgeteilt und 10 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die Pellets waren anschließend zweimal mit 50 ml 0,5 x YPDA_{Kan}-Medium gespült in 5 ml YNB_{Kan}-Medium (50 μ g/ml) resuspendiert worden. Die Hefezygoten wurden in 200 μ l Aliquots auf 15 cm-Platten mit Selektionsmedium, das weder Leucin

Material und Methoden

noch Tryptophan, Histidin oder Adenin enthielt, ausplattiert. Die nach 7-12 Tagen erschienenen Kolonien wurden auf eine 15 cm-Masterplatte überführt, dessen Selektionsmedium 200 µl X- α -Gal enthielt. Die Hefen wurden für drei Tage bei 30°C bebrütet bis blau gefärbte Klone vorhanden waren. Diese Kolonien wurden für weitere Untersuchungen gestockt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.5 Test auf Selbstaktivierung

Zur Kontrolle, dass die funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors und dadurch die Expression der Reportergene nur aufgrund der Protein-Protein-Interaktion entstanden und nicht durch das *Bait*-Protein bzw. das *Prey*-Protein allein erfolgten, wurden Selbstaktivierungstests durchgeführt. Dafür wurde das *Bait*-Plasmid mit dem unfusionierten *Prey*-Plasmid bzw. jedes aus dem Screening erhaltene *Prey*-Plasmid mit dem unfusionierten *Bait*-Plasmid in AH109-Hefen transformiert. Die transformierten Zellen waren auf SD-Leu⁻/Trp⁻-Medium ausplattiert und 3 Tage bei 30°C bebrütet worden. Die Kolonien, welche nur durch eine erfolgreiche Doppeltransformation, entstanden, wurden auf SD-Leu⁻/Trp⁻/His⁻/Ade⁻-Medium, das zusätzlich X- α -Gal beinhaltete, ausgestrichen und weitere 3 Tage bebrütet. Fand eine Selbstaktivierung statt, entstanden auch auf diesem Minimalmedium blau gefärbte Kolonien.

Parallel zum Selbstaktivierungstest wurde auch die Interaktion der Proteine nochmals bestätigt, indem die aus dem Screening isolierte *Bait*-und *Prey*-Plasmid-DNA mittels Doppeltransformation in den Hefestamm AH109 gebracht und dieser auf SD-Leu⁻/Trp⁻/His⁻/Ade⁻-Medium ausgestrichen wurde. War eine Interaktion der Proteine vorhanden, resultierte dies in der Aktivierung und Expression der Reportergene, wodurch das Wachstum und die Blaufärbung der Hefezellen ermöglicht wurden. Zur Identifizierung der aus dem Hefe-Screening erfassten cDNA-Sequenzen wurde 1µg der Plasmid-DNA nach der Kontrolle auf Selbstaktivierung sequenziert.

2.3 Biochemische Standardmethoden

2.3.1 Heterologe Expression rekombinanter Proteine im analyt. Maßstab

	pET-Vektor-System	pMAL-Vektor-System
Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol, pH 8,0 mit NaOH	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 200mM NaCl 1 mM EDTA

Die heterologe Expression der JumonjiC-Domäne des C-Modul-bindenden Faktors A fand in zwei verschiedenen Systemen statt. Zum einen wurden das *pMALTM Protein Fusion and*

Purification System (NEB), das zu einem Fusionsprotein der JmjC-Domäne mit dem Maltose-Bindeprotein (MBP) führte, genutzt und zum anderen das *pET Expression System 33b* (Novagen) verwendet, welches ein Fusionsprotein mit einem 6 fachen Histidin-*tag* generierte.

Nach Klonierung der JmjC-Sequenz in die entsprechenden Vektoren (pMAL-c2X (NotI) bzw. pET-33b(+)) wurden die Plasmide in verschiedene Expressionsstämme nach den Angaben des Herstellers transformiert. Die Selektion der mit dem pET-33b(+)-Vektor transformierten Zellen erfolgte auf LB_{Kan}-Medium (30 µg/ml), der mit dem pMAL-c2X-Vektor transformierten Zellen auf LB_{Amp}-Medium (100 µg/ml). Wurden Bakterien verwendet, die ein zusätzliches Plasmid trugen (RIL, Rosetta), musste ein weiteres Antibiotikum zur Selektion dieses Plasmides zum Medium gegeben werden. Zur Herstellung der Vorkultur waren Zellen einer Kolonie in 10 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C und 200 *rpm* kultiviert worden. Eine Hauptkultur von 50 ml wurde zwei prozentig inokuliert und weitere 30 bis 60 Minuten bei 37°C und 200 *rpm* bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 geschüttelt. Nachdem ein Milliliter der Zellkultur entnommen und pelletiert worden war, wurde durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM die Expression des Zielproteins für 2 Stunden induziert. Von den induzierten Zellen wurde ebenfalls ein Zellpellet aus einem Milliliter der Kultur hergestellt. Die Bakterien wurden anschließend bei 4.000 x g für 20 Minuten bei 4°C geerntet, das Nassgewicht bestimmt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

Eine Modifikation der Kultivierung erfolgte bei Zellen der ArcticExpressTM-Stämme. Die Vorkultur wurde bei 30°C inkubiert, während die Hauptkultur bei nur 12°C über Nacht kultiviert wurde.

Die Zellyse erfolgte durch Resuspendieren der Zellen in mit Proteaseinhibitoren (je 5 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und AEBSF) versetzten Lysispuffer (5 ml pro Gramm Nassgewicht der Zellen) und anschließender Inkubation mit 1 mg/ml Lysozym für 30 Minuten auf Eis. Zusätzlich waren die Zellen zwei Minuten lang für 15 Sekunden bei 200-300 W auf Eis gefolgt von 10 Sekunden Pause sonifiziert worden. Dem Zellysat wurde eine 100 µl Probe entnommen und eingefroren. Die restliche Suspension war 10 Minuten bei 9.000 x g und 4°C pelletiert worden. Von dem Überstand und dem in 5 ml 1 x PBS wieder aufgenommenen Zellpellet wurden je 100 µl entnommen und eingefroren. Die Aliquots dienten zur Analyse der Löslichkeit als Probe für ein Polyacrylamidgel.

2.3.2 Denaturierende Aufreinigung rekombinanter Proteine im analyt. Maßstab

Denaturierungspuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 6 M GuHCl pH 8,0 mit NaOH	Elutionspuffer A:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 6 M GuHCl pH 5,9 mit HCl
Waschpuffer:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 6 M GuHCl pH 6,3 mit HCl	Elutionspuffer B:	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris 6 M GuHCl pH 4,5 mit HCl

Für die denaturierende Aufreinigung wurde nur rekombinantes Protein, das im *pET-Expression System 33b* exprimiert worden war, verwendet, da die Immobilisierung über einen 6 x Histidin-tag erfolgte. Eine denaturierende Aufreinigung des MBP-Fusionsproteins war aufgrund der dadurch zerstörten Proteinstruktur des MBP nicht möglich.

Das in 1 x PBS gelöste Pellet des Zelllysates wurde auf Eis aufgetaut, bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nachdem 2 ml Denaturierungspuffer, der 1 mM DTT enthielt, zum Pellet pipettiert wurde, inkubierte dieses bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln bis alle Bakterienbestandteile denaturiert waren. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl einer Ni²⁺-NTA-Agarose (Qiagen), welche 5-10 mg/ml Protein band, für eine Stunde bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Das Gemisch wurde anschließend in eine Glassäule mit Fritte gegeben und zweimal mit vier Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Elutionen erfolgten nach 10-minütiger Inkubation zweimal mit 250 µl Elutionspuffer A und in gleicher Weise mit Elutionspuffer B und wurden vereint. Zur Kontrolle der Elution wurde die auf der Fritte verbleibende Ni²⁺-NTA-Resin in 500 µl Elutionspuffer B verdünnt und 100 µl in ein Reaktionsgefäß überführt. Das gereinigte Protein wurde bei -20°C gelagert.

2.3.3 Heterologe Expression und denaturierende Aufreinigung rekombinanter Proteine im präparativen Maßstab

Die heterologe Expression des CbfA-Derivates inklusive der JmjC-Domäne (CbfA⁸⁸⁻³⁷⁰) fand unter der Verwendung des Plasmides pET-33b(+)-JmjC158/167 in dem *E. coli*-Expressionsstamm RosettaTM(DE3) statt. Eine Vorkultur, deren LB-Medium 30 µg/ml Kanamycin und 34 µg/ml Chloramphenicol enthielt, wurde mit Zellen der Kolonie #1 beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Das Selektionsmedium der Hauptkultur (LB_{Kan}: 30 µg/ml Kanamycin) war zu je 500 ml auf zwei Kolben mit je einem

Liter Volumen aufgeteilt und zweiprozentig mit der Vorkultur inokuliert worden. Hatte die OD_{600} der Zellen den Wert von 0,6 erreicht, wurde die Expression durch Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und weitere 4 Stunden geschüttelt. Anschließend waren die Zellen bei 4.000 x g für 20 Minuten bei 4°C pelletiert, das Feuchtgewicht bestimmt und bei -80°C eingefroren worden. Am folgenden Tag wurde das Bakterienpellet auf Eis aufgetaut und 15 ml Lysispuffer (5 ml pro Gramm Feuchtgewicht), der zuvor mit Proteaseinhibitoren (je 5 µg/ml Aprotinin, Leupeptin und AEBSF) versetzt worden war, resuspendiert und für 30 Minuten mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Nach der Zugabe von LDAO mit einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) wurden die teilweise lysierten Zellen durch wiederholte 15-sekündige Sonifikation (200-300 W) gefolgt von 10 Sekunden Pause auf Eis vollständig aufgebrochen. Das Bakterienlysats war für 20 Minuten bei 9.000 x g und 4°C zentrifugiert worden, wobei der Überstand mit löslichen Proteinen verworfen wurde. Die pelletierten *inclusion bodies* waren in 15 ml mit Proteaseinhibitoren und LDAO versetzten Lysispuffer in einem Dounce-Homogenisator überführt, homogenisiert und erneut zentrifugiert worden. Dieser Vorgang wurde dreimal durchgeführt bevor die *inclusion bodies* zweimal in Lysispuffer zum Entfernen des LDAO resuspendiert wurden. Nachdem das Nassgewicht von 0,5 g/1 l *E. coli*-Kultur bestimmt worden war, wurde das Pellet in 20 ml Denaturierungspuffer (inkl. 1 mM DTT) aufgenommen und bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Wurde die Lösung transparent, waren alle unlöslichen Proteine denaturiert. Nun konnten restliche Zelltrümmer durch Zentrifugieren bei 9.000 x g für 20 Minuten und 4°C abgetrennt werden. Der Überstand war in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose versetzt worden. Die Suspension wurde für eine Stunde auf einem Rotator bei 4°C inkubiert und anschließend in eine Glassäule mit Fritte überführt. Das Gemisch wurde zweimal mit 15 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mittels 10-minütiger Inkubation nacheinander in Elutionspuffer A bzw. B, wobei viermal je ein Milliliter verwendet wurde. Zum Schluss wurde die auf der Fritte verbliebene Ni^{2+} -NTA-Agarose mit einem Milliliter Elutionspuffer B versetzt und ein 100 µl Aliquot in ein Reaktionsgefäß überführt. Alle Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.3.4 Rückfaltung der denaturierten und aufgereinigten JmjC-Domäne

Um den für das JmjC-Protein geeigneten Rückfaltungspuffer zu finden, wurde ein Screening von 15 verschiedenen Puffern, die jeweils auf die pH-Werte 7,5 und 10 eingestellt wurden, durchgeführt. Die dafür verwendeten Pufferzusammensetzungen wurden nachfolgend aufgelistet.

Material und Methoden

Tabelle 1: Renaturierungspuffer; * Solubilisierer, §DDM: n-Dodecyl-beta-D-maltosid

Puffer	1 M Tris-HCl, pH 10	NaCl	Solubil.*	Stabilisator 1	Stabilisator 2
0	50 mM	50 mM			
1	50 mM	50 mM	0,8 M Urea		
2	50 mM	50 mM		40 % Glycerol	
3	50 mM	50 mM	0,8 M Urea	40 % Glycerol	
4	50 mM	50 mM		0,4 g/l PEG 3350	
5	50 mM	50 mM	0,8 M Urea	0,4 g/l PEG 3350	
6	50 mM	50 mM			0,75 M Arginin
7	50 mM	50 mM		0,4 g/l PEG 3350	0,75 M Arginin
8	50 mM	50 mM		25 % Ethanol	
9	50 mM	250 mM		10 mM Triton X-100	
10	50 mM	250 mM		0,3 mM DDM§	
11	50 mM	50 mM			4 M K-Glutamat
12	50 mM	50 mM			0,5 M Tris-HCl pH10
13	50 mM	50 mM		0,3 mM DDM§	0,75 M Arginin
14	50 mM	50 mM		20 % Glycerol	

Vor der Rückfaltung musste das gereinigte Protein stärker reduziert werden. Dazu wurde der Proteinlösung DTT mit einer Endkonzentration von 100 mM zugefügt und diese für zwei Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt.

Der Rückfaltungsansatz für jeden Puffer war wie folgt in einem Reaktionsgefäß zusammengesetzt worden.

950 µl des jeweiligen Puffers
10 µl 100 mM EDTA
30 µl 100 mM DTT

Unter Schütteln bei 600 *rpm* und 4°C wurden tropfenweise 50 µl denaturiertes Protein zu den Pufferansätzen pipettiert und diese über Nacht bei 900 *rpm* und 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Ansätze für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die Überstände sofort in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.3.5 *In vitro* Transkription und Translation von Proteinen

Für dieses Verfahren wurden die Plasmide pGBKT7-JmjC131/132, das die JumonjiC-Domäne von CbfA codierte und pGADT7-Rec, welches die im Hefe-Screening erfasste cDNA beinhaltete, verwendet. Diese Plasmide enthielten zusätzlich entweder einen c-Myc- oder HA-tag und einen dem Insert vorgelagerten T7 RNA Polymerase-Promotor. Die durch eine Fällung mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gereinigte Plasmid-DNA wurde nach Empfehlungen des Herstellers in eine *in vitro* Transkriptions/Translations-Reaktion (TNT[®]T7 Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega) eingesetzt. Durch Verwendung von [³⁵S]-Methionin (L-[³⁵S]-Methionin, 1175 Ci/mmol),

Hartmann Analytic) waren die translatierten Proteine radioaktiv markiert worden. Zur Kontrolle der Markierung und der Expression wurde ein Teil des Reaktionsansatzes auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

2.3.6 Radioaktive *in vitro* Coimmunopräzipitation

Für die Coimmunopräzipitation wurden [³⁵S]-Methionin markierte Proteine, die zuvor mittels einer Transkription/Translations-Reaktion *in vitro* hergestellt wurden, unter Verwendung des *MatchmakerTM Co-IP Kits* (Clontech) eingesetzt. Dazu waren je 10 µl des Transkription/Translations-Ansatzes des CbfA-Derivates und des ermittelten Bank-Proteins in ein Reaktionsgefäß gegeben, sorgfältig gemischt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert worden. Durch Zugabe des spezifischen Primär-Antikörpers wurde das JumonjiC-Fusionsprotein an diesen für eine Stunde bei 4°C gebunden. Anschließend wurden 3 µl Protein-A-Beads mit 1 x PBS äquilibriert und zu dem Reaktionsansatz pipettiert. Die Proteine wurden durch Rotieren für eine Stunde bei 4°C immobilisiert. Danach wurden die Protein-A-Beads fünf Mal mit Waschpuffer 1 und zwei Mal mit Waschpuffer 2 behandelt. Zwischen den Waschschritten waren die *Beads* bei 4.500 x g sedimentiert und der Überstand verworfen worden. Zum Schluss wurden die *Beads* in 10 µl 2 x Laemmli-puffer resuspendiert und die Proteine durch Erhitzen auf 80°C für fünf Minuten von den *Beads* eluiert und denaturiert. Die Immunopräzipitation wurde mittels der SDS-PAGE und durch Autoradiographie analysiert.

2.3.7 Nicht radioaktiver *Pull-down-Assay*

IPP-Puffer: 150 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 Proteaseinhibitoren

IPPN-Puffer: 150 mM NaCl
 10 mM Tris-HCl, pH 8,0
 0,1 % (*v/v*) Nonidet P-40
 Proteaseinhibitoren

Die mit dem Plasmid pDV-NTAP-NYFP-Set1¹⁷⁷⁻³²⁸ transformierten Zellen des *D. discoideum*-Stamm AX2 wurden in einer HL5_{G418}-Schüttelkultur (5 µg/ml) bei 22°C und 150 rpm bis zu einer Anzahl von 2 x 10⁹-Zellen kultiviert. Die Zellen konnten durch Zentrifugieren bei 500 x g für fünf Minuten und 4°C geerntet werden. Das Zellpellet war zweimal in 40 ml 1 x Phosphatpuffer gewaschen, durch Zugabe von 5-10 ml IPP-Puffer mit 1%igem (*v/v*) Triton X-100 resuspendiert und durch Inkubation für 30 Minuten auf Eis lysiert worden. Die Lyse wurde unterstützt indem die Zellen anschließend mit einem Dounce-Homogenisator dreimal mit Pistill A (*loose*) und dreimal mit Pistill B (*tight*)

Material und Methoden

homogenisiert wurden. Das Zelllysate wurde anschließend für 20 Minuten bei 4°C und 9.000 x g zentrifugiert. Von dem Überstand war ein 300 µl Aliquot (Input) hergestellt und bei 4°C gelagert worden. Der restliche Überstand wurde mit 0,1 % Nonidet P-40 in IPP-Puffer und 200 µl Maus-IgG-Agarose (Sigma-Aldrich) versetzt und für eine Stunde bei 4°C rotiert. Die Suspension wurde in ein Milliliter Volumina aliquotiert und ebenfalls bei 4°C gelagert. Ein Aliquot der Suspension war mit 500 µl eines AX2-Kernextraktes (Kapitel 2.4.5) versetzt und für eine Stunde bei 4°C rotiert worden. Als Kontrolle diente ein 40 µl „leeres“ Agarose-Aliquot (Ultrogel A4, Sigma-Aldrich), das mit IPPN-Puffer und mit 500 µl AX2-Kernextrakt unter denselben Bedingungen behandelt wurde. Die Agarose wurde dreimal mit IPPN-Puffer gewaschen, für zwei Minuten bei 50 x g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Elution der Proteine war die Agarose fünf Minuten bei 95°C in 2 x Laemmli-Puffer gekocht und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden. Die Präzipitation wurde auf ein 10%iges Polyacrylamid-gel aufgetragen und die Proteinbanden mittels *Western-Blot*-Analyse detektiert.

2.3.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Nuclear-Lysis-Puffer:	100 mM HEPES, pH 8,0 20 mM EDTA 2 % (v/v) Triton X-100 2 % (w/v) SDS 0,2 mM PMSF 25 x Proteaseinhibitoren	Hochsalzpuffer:	20 mM HEPES, pH 8,0 500 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS 2 mM EDTA
Verdünnungspuffer:	16,7 mM HEPES, pH 8,0 1 % (v/v) Triton X-100 1,2 mM EDTA 167 mM NaCl 0,2 mM PMSF 25 x Proteaseinhibitoren	LiCl-Puffer:	10 mM HEPES, pH 8,0 0,25 M LiCl 1 % (v/v) Nonidet P-40 1 % (w/v) Natrium-desoxycholat 1 mM EDTA
Niedrigsalzpuffer:	20 mM HEPES, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS 2 mM EDTA	TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
		Elutionspuffer:	1 % (w/v) SDS 100 mM NaHCO ₃

Für die Chromatin-IP wurde der *D. discoideum*-Stamm JH.D verwendet, welcher durch eine Doppeltransformation die Plasmidkonstrukte pGEM-cbfa03 und pISAR erhielt. Hatte die Doppeltransformation stattgefunden, konnten die Zellen aufgrund der Neomycin-Geneticin-Resistenz, die durch das Plasmid pISAR vermittelt wurde, mit dem Antibiotikum G418 selektioniert werden. Diese selektionierten Zellen waren mittels des Konstrukts pGEM-cbfa03 in der Lage, das Fusionsprotein NTAP-NYFP-Cbfa⁶¹⁻¹⁰⁰⁰, das als TAP-

CbfA bezeichnet worden war, zu exprimieren und somit eine TAP-ChIP zu ermöglichen. Für Chromatin-Immunopräzipitationen, die anhand von Histonmethylierungen durchgeführt wurden, waren untransformierte AX2-Zellen bzw. JH.D-Zellen verwendet worden.

Die transformierten JH.D-Zellen wurden in HL5-Medium kultiviert und mit 5 µg/ml G418 selektioniert. Hatte die Kultur eine ausreichende Zelldichte erreicht, wurden 2×10^8 Zellen durch Zentrifugieren für fünf Minuten bei $300 \times g$ und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml 1 x Phosphatpuffer, der mit 1 % Paraformaldehyd versetzt war, resuspendiert. Die Zellen waren anschließend auf einem Schüttler für 15 Minuten bei 150 *rpm* durch das PFA fixiert worden. Zu den fixierten Zellen war Glycin mit einer Endkonzentration von 200 mM hinzu gegeben und die Zellsuspension weitere fünf Minuten geschüttelt worden. Die erneut zentrifugierten Zellen wurden zweimal in 50 ml eiskaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen, wobei dem Phosphatpuffer in dem zweiten Waschschrift 1 % (*v/v*) Triton X-100 zugesetzt wurde. Das gewaschene Zellpellet war in gekühlten 1 x Phosphatpuffer resuspendiert worden. Dabei wurde ein Milliliter der Pufferlösung für je 1×10^8 Zellen verwendet. Die Zellen wurden zu einem Milliliter in kleine Reaktionsgefäße aliquotiert, mit $16.000 \times g$ pelletiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zum Sonifizieren waren 1×10^8 Zellen auf Eis aufgetaut und mit 250 µl Nuklear-Lysis-Puffer versetzt worden. Um ein geeignetes Volumen zu erhalten, wurde die Suspension mit MQ-Wasser auf 500 µl aufgefüllt und die Zellen darin resuspendiert. Diese wurden in einem Eiswasserbad siebenmal für 10 Sekunden sonifiziert, wobei 50 Sekunden nach jeder Sonifikation pausiert wurde. Das Ultraschallgerät war auf einen Arbeitszyklus von 45 % und einen *Output* von 25 % eingestellt. Um den Zellaufschluß und die Zerkleinerung der genomischen DNA zu überprüfen, wurde ein Aliquot von 30 µl dem Zelllysats entnommen, in ein kleines Reaktionsgefäß überführt, mit TE-Puffer auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und durch Zugabe von 8 µl 5 M NaCl bei 65°C über Nacht inkubiert. Die restliche Zellprobe wurde bei -80°C gelagert.

Dem Aliquot wurde am folgenden Tag 4 µl von 0,5 M EDTA, 8 µl von 1 M Tris-HCl (pH 6,5) und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) zugegeben und bei 45°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend war die Chromatin-DNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert, mittels Ethanol präzipitiert und in 50 µl TE-Puffer gelöst worden. Nach einer abschließenden RNA-Restriktion für 30 Minuten bei 37°C durch Zugabe von 2 µl RNase A (1 mg/ml) wurde der gesamte DNA-Ansatz auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Der Hauptanteil der gescherten DNA sollte eine Größe um die 500 bp aufweisen. War dies nicht der Fall, wurden weitere

Material und Methoden

Ultraschallzyklen an der bereits sonifizierten Zellprobe durchgeführt. Dafür war das Zelllysate auf Eis aufgetaut und ein-bis zweimal zusätzlich geschert worden. Die Zellprobe wurde verdünnt, indem 200 µl des Lysates mit 1800 µl Dilutionspuffer versetzt wurde. Da von der sonifizierten Zellprobe ca. 400 µl vorhanden waren, konnten zwei Aliquots mit je 2 ml Volumen hergestellt werden. Anschließend waren die Proben 2 Minuten bei 16.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt worden.

Für die folgende Immunopräzipitation musste eine Vorreinigung des Lysates durchgeführt werden. Dafür wurden 40 µl „leerer“ Agarosebeads (Ultrogel A4, Sigma-Aldrich) zu einem 2-ml-Aliquot gegeben und für 1 Stunde bei 4°C rotiert, während das zweite 2-ml-Aliquot für weitere Präzipitationen bei -80°C gelagert wurde. Die Agarose wurde durch vorsichtiges Zentrifugieren mit 500 x g von dem Zelllysate getrennt. Der vorgereinigte Überstand beinhaltete nur DNA-Protein-Komplexe, die nicht an Agarosebeads binden und dadurch unspezifische Präzipitate darstellen konnten. Dieser Überstand war zu je einem Milliliter auf zwei Reaktionsgefäße (*low bind*) aufgeteilt worden. Der einen Probe wurde 40 µl Maus-IgG-Agarose (Sigma-Aldrich) zugeführt und stellte die immunopräzipitierte Probe da (ChIP). Dem anderen Aliquot wurde 40 µl Agarose ohne IgG (Ultrogel A4, Sigma-Aldrich) zugeführt und war somit die Negativkontrolle der Immunopräzipitation (no ChIP). Beide Proben rotierten für mindestens drei Stunden bei 4°C. Anschließend wurden die DNA-Protein-Agarose-Komplexe bei 50 x g zentrifugiert. Ein Aliquot von 200 µl des Überstandes der Negativkontrolle (no ChIP) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diese Probe (20 % Input) stellte den Anteil des Ausgangsmaterials der DNA-Protein-Komplexe da. Der restliche Überstand sowie der Überstand der ChIP-Probe wurde verworfen. In sieben Waschschritten wurden nicht immunopräzipitierte DNA und ungebundene Proteine beider Proben (ChIP, no ChIP) entfernt. Die ersten beiden Waschschrritte wurden mit einer Salzkonzentration von 150 mM NaCl durchgeführt, darauf folgte ein Waschschrritt mit 500 mM NaCl und zwei weitere Waschschrritte mit 250 mM LiCl. Die letzten beiden Waschschrritte erfolgten in TE-Puffer. Zwischen den Waschschrritten waren beide Proben vorsichtig bei 50 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen worden. Weiterhin wurden beide Gemische vor dem letzten Waschschrritt in ein neues Reaktionsgefäß (*low bind*) überführt.

Die gewaschenen DNA-Protein-Komplexe konnten von der Agarose eluiert werden, indem 100 µl des Elutionspuffers zu den Proben gegeben, diese mechanisch verwirbelt und 15 Minuten bei 65°C inkubiert wurden. Die Proben waren mit 16.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand, der die Elution darstellte, in ein neues Reaktionsgefäß

überführt worden. Der Elutionsschritt wurde wiederholt und die Elutionen zu einem Volumen von 200 µl vereinigt.

Der ChIP-Elution, der Elution der Negativkontrolle und der Input-Probe wurden 8 µl von 5 M NaCl zugeführt und bei 65°C über Nacht mit 100 *rpm* geschüttelt. Am folgenden Tag waren alle Gemische mit 4 µl von 0,5 M EDTA, 8 µl von 1 M Tris-HCl (pH 6,5) und 2 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt worden und inkubierten bei 45°C für eine Stunde. Anschließend wurde jeder Probe 2 µl RNase A (1 mg/ml) für 30 Minuten bei 37°C zugeführt.

Die Aufreinigung der präzipitierten DNA, der DNA aus der Negativkontrolle und der Input-DNA erfolgte mittels dem *Qiaquick® PCR Purification Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dabei entstand ein Elutionsvolumen von 80 µl.

Mittels der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion sollten Gene amplifiziert werden, die unter der Vermutung standen, präzipitiert worden zu sein. Außerdem wurden Gene untersucht, die als Positiv- bzw. Negativkontrolle der ChIP-Methode dienten. Die PCR für jedes Gen wurde an den drei DNA-Proben durchgeführt und vergleichend auf ein zweiprozentiges Agarosegel aufgetragen.

2.3.9 Immunofluoreszenz

Mounting-Medium: 20 mM Tris-HCl, pH 8,5
90 % (*v/v*) Glycerol
0,25 µg/ml DAPI
1 µg/ml p-Phenylendiamin

Zum spezifischen Nachweis von Histonmethylierungen wurde die Methode der Immunofluoreszenz an Zellen der *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D durchgeführt. Dafür waren 200 µl einer Kultur mit 1×10^6 Zellen/ml auf einen Glasobjektträger pipettiert worden. Nachdem sich die Zellen abgesetzt hatten, wurden diese in 1 x Phosphatpuffer, der 4 % (*w/v*) Paraformaldehyd enthielt, für 10 Minuten in einer Coplin-Färbeküvette inkubiert. Anschließend wurde der Objektträger in eine weitere Färbeküvette mit 1 x Phosphatpuffer und 0,2 % (*v/v*) Triton X-100 überführt und schließlich fünfmal in 1 x PBS gewaschen. Alle folgenden Inkubationsschritte waren in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt worden, wobei die Zellen mit Parafilm abgedeckt waren. Zum Blocken von unspezifischen Bindungen wurden die Zellen mit 100 µl Blockierungslösung, die aus 2 % (*w/v*) BSA und 4 % Ziege-Serum in 1 x PBS bestand, für eine Stunde bedeckt. Der Primär-Antikörper wurde in der Blockierungslösung je nach Empfehlungen des Herstellers verdünnt. 30 µl der Verdünnung wurden zu den Zellen gegeben und diese weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend waren die Zellen dreimal

für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen worden. Der Sekundär-Antikörper wurde ebenfalls in der Blockierungslösung 1:500 verdünnt. Nachdem 30 µl der Antikörperlösung mit den Zellen inkubierten, wurden diese dreimal für fünf Minuten mit 1 x PBS gewaschen und mit 10 µl des *mounting*-Mediums versetzt. Die Zellen waren mit einem Deckgläschen versiegelt worden und konnten in Dunkelheit bei 4°C gelagert werden.

2.4 Zellbiologische und molekularbiologische Methoden für *Dictyostelium discoideum*

2.4.1 Allgemeine Kulturbedingungen für verschiedene *D. discoideum*-Stämme

Die axenisch wachsenden *D. discoideum*-Stämme AX2 und JH.D wurden in HL5-Medium in 9 cm-Petrischalen bei 22°C als adhärente Zellkultur angezüchtet. Da der Stamm JH.D ein Plasmid für die CbfA-Suppression enthielt, wurden diese Zellen mit 5 µg/ml Blasticidin S für eine Passage selektioniert. Erfolgte an *D. discoideum*-Zellen eine Transformation wurden AX2-Zellen mit 10 µg/ml G418, JH.D-Zellen mit 5 µg/ml G418 selektioniert. Bei einer Konfluenz der Petrischalen von 70-90 % waren die Zellen zur weiteren Kultivierung in eine Schüttelkultur bei 22°C und 150 *rpm* überführt worden, wobei die Zellen bei einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml geerntet oder entsprechend verdünnt wurden.

Der *D. discoideum*-Stamm JH.D(ura⁻) wurde in FM-Medium unter Zusatz von Uracil (20 µg/ml) in 9 cm-Petrischalen bei 22°C kultiviert. Nach einer Doppeltransformation des UMP-Synthase-Gen codierenden und einem beispielsweise das Fusionsprotein codierenden Plasmids, waren die Zellen über Nacht in Uracil enthaltenden FM-Medium angezüchtet worden bevor sie mit FM-Medium ohne Uracil selektioniert wurden.

2.4.2 Präparation von Zelllysaten

Zur Analyse von Proteinexpressionen oder für die RNA-Extraktion wurden Zelllysate angefertigt, indem pro Lysat ein Kulturvolumen mit 2×10^7 Zellen für fünf Minuten bei 4°C und 250 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 x Phosphatpuffer gewaschen wurde. Nach erneutem Zentrifugieren waren die Zellen je Lysat in einem Milliliter 1 x Phosphatpuffer resuspendiert und in ein kleines Reaktionsgefäß überführt, für eine Minute bei 16.000 x g pelletiert und bei -80°C für mindestens eine Stunde gelagert worden.

2.4.3 Herstellung von Kernextrakten

Lysis-Puffer: 30 mM HEPES, pH 8,0
 10 mM KCl
 10 mM Mg-Acetat
 10 % (w/v) Saccharose
 2 % (v/v) Triton X-100
 1 mM EDTA
 1 mM DTT

Grundpuffer 15-600: 20 mM HEPES, pH 8,0
(GP15-600) 10 mM MgCl₂
 1 mM EDTA
 1 mM DTT
 15 % (v/v) Glycerin
 15-600 mM KCl (Zahlenwert entspricht KCl-Konzentration)

Die Herstellung der Zellkernextrakte erfolgte in Anlehnung an die Anleitungen von Geier *et al.* (1996) und Hentschel *et al.* (2001). Für die Präparation wurde eine Schüttelkultur von 200 ml bei 150 *rpm* und 22°C angezogen. Das 1 x 10⁹ Zellen enthaltende Kulturvolumen war für fünf Minuten bei 500 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet zweimal in 100 ml kaltem 1 x Phosphatpuffer gewaschen worden. Auch alle folgenden Schritte wurden mit gekühlten Puffern und auf Eis durchgeführt. Die Zellyse erfolgte für 10 Minuten in 20 ml Lysispuffer, der zuvor mit DTT (Endkonzentration 1mM) und 60 µg/ml Leupeptin versetzt worden war. Das Lysat wurde mittels eines *Dounce*-Homogenisators dreimal mit dem Pistill A (*loose*) und nach 10-minütiger Inkubation auf Eis weitere fünfmal mit Pistill B (*tight*) homogenisiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Sedimentation der Zellkerne erfolgte durch Zentrifugieren bei 4°C für 20 Minuten mit 10.000 x g. Nachdem der Überstand verworfen wurde, war das Pellet in zwei Milliliter mit DTT und Leupeptin versetzten Lysispuffer resuspendiert und erneut dreimal mit Pistill B homogenisiert und für 10 Minuten bei 4°C und 9.000 x g zentrifugiert worden. Das Zellkernpellet wurde in zwei Milliliter GP15-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Alle für die folgenden Kernextraktionen verwendeten GP-Puffer enthielten 1 mM DTT und 20 µg/ml Leupeptin. Für die Extraktionen wurden die Zellkerne dreimal in zwei Milliliter GP50-Puffer und anschließend gleichermaßen in GP600-Puffer resuspendiert und für 5-10 Minuten bei 4°C und 9.000 x g zentrifugiert. Die Überstände der GP600-Fractionen (KE600) wurden gesammelt und vereint, da in diesen die Kernproteine enthalten waren. Der Zellkernextrakt KE600 wurde anschließend gegen 20 Volumenanteile GP15-Puffer mit 1 mM DTT zweimal für 1,5 Stunden dialysiert und als ein Milliliter Aliquot bei -80°C gelagert.

2.4.4 Peptid-*Pull-down-Assay*

Zur Analyse von Peptid-Protein-Interaktionen aufgrund von post-translationalen Modifikationen an Histonen wurde ein Interaktionsassay durchgeführt. Für den *Assay* wurde ein unmodifiziertes Histon H3-Peptid und zwei modifizierte Histon H3-Peptide, die am Lysin 4 bzw. am Lysin 9 dreifach methyliert waren, verwendet. Die Peptide wurden freundlicher Weise am Institut für Biochemie (FSU, Jena) in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Diana Imhof synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Die lyophilisierten Peptide wurden in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) mit einer Endkonzentration von 3 µg/µl aufgenommen. Weiterhin wurde von dem *D. discoideum*-Stamm AX2 Zellkernproteine wie unter Kapitel 2.4.3 beschrieben, extrahiert und mittels *Western-Blot* mit dem Antikörper 7F3 auf den Gehalt von CbfA überprüft.

Für den *Assay* wurden 200 µl Kernextrakt mit 10 µl Peptidlösung (3µg/µl) in einem Reaktionsgefäß (*low bind*) vermischt, mit 0,1 % (*v/v*) Triton X-100 enthaltenen GP50-Puffer auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei 4°C rotiert. Als Negativkontrolle diente neben dem unmodifizierten Histon H3-Peptid auch eine Leerkontrolle, der kein Peptid zugeführt und die unter denselben Bedingungen behandelt wurde. Unterdessen waren magnetische Streptavidin-gekoppelte *Beads* (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Invitrogen) vorbereitet worden, indem je *Pull-down* 25 µl der *Beads* dreimal mit 50 µl 0,1 % (*v/v*) Triton X-100 enthaltenden 1 x PBS gewaschen und in 25 µl GP50-Puffer mit 0,1 % (*v/v*) Triton X-100 aufgenommen wurden. Zu jedem Gemisch wurden 25 µl der gewaschenen *Beads* pipettiert und ein bis drei weitere Stunden bei 4°C rotiert. Anschließend waren die Magnet-*Beads* mit 0,1 % (*v/v*) Triton X-100 enthaltenden GP50-Puffer fünf- bis siebenmal gewaschen worden, wobei diese magnetisch aus der Lösung isoliert werden konnten. Vor der letzten Magnetisolation wurden die *Beads* in ein neues Reaktionsgefäß (*low bind*) überführt. Die Elution der Proteine erfolgte durch 5-minütiges Aufkochen der *Beads* in 2 x Laemmli-Puffer bei 95°C. Die eluierten Proteinproben wurden auf ein 10%iges Polyacrylamidgel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und mit Hilfe der *Western-Blot*-Analyse unter Verwendung des CbfA-Antikörpers 7F3 detektiert.

2.4.5 Wachstums- und Entwicklungs-Phänotypisierung von Mutanten

Zur Analyse sowohl von Morphologie wie auch von Wachstum und Entwicklung verschiedener CbfA-Mutanten wurden transformierte *D. discoideum*-Zellen des Stammes JH.D(ura⁻) auf Phosphatplatten ausplattiert und bis zur vollständigen Differenzierung über einen bestimmten Zeitraum lichtmikroskopisch beobachtet. Dafür waren 1 x 10⁸ Zellen der entsprechenden Schüttelkultur für fünf Minuten bei 120 x g und 4°C zentrifugiert, der

Überstand verworfen und das Zellpellet mit 20 ml 1 x Phosphatpuffer zweimal gewaschen worden. Die Zentrifugenschritte wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt und der Überstand abgenommen. Anschließend waren die in fünf Milliliter 1 x Phosphatpuffer resuspendierten Zellen auf einer Phosphatplatte ausgestrichen worden. Nachdem sich die Zellen für 30 Minuten abgesetzt hatten, wurde die verbleibende Flüssigkeit von der Platte entfernt und diese kurz unter der Sterilbank getrocknet. Die Zellen inkubierten bei 22°C über Nacht. Nach 18, 22, 26, 30 und 44 Stunden Inkubation wurden die Zellen lichtmikroskopisch betrachtet.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht zum Stand der Forschung in der funktionellen Charakterisierung von CbfA

Der C-Modul-bindende Faktor Δ (CbfA) ist ein aus 1.000 Aminosäuren bestehendes Multidomänenprotein, dessen molekulare Masse 114 kDa beträgt (Winckler *et al.*, 2004). Es konnte in allen Lebensphasen von *Dictyostelium discoideum* in einer gleichbleibenden Menge durch eine spezifische *Western-Blot*-Analyse nachgewiesen werden.

Das Protein wurde anhand der Bindung des C-Moduls des Retrotransposons TRE5-A erstmalig identifiziert (Geier *et al.*, 1996). Durch den Nachweis von CbfA in aufgereinigten Zellkernextrakten wurde eine Lokalisierung im Zellkern vermutet (Geier *et al.*, 1996; Henschel *et al.*, 2001).

Durch Untersuchungen der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D, welche nur ca. 5 % des Wildtyplevels von CbfA bildet, wurden phänotypische Veränderungen festgestellt. Eine dieser Veränderungen ist die geringere Phagozytoserate von auf Bakterien wachsenden Zellen der CbfA-Mutante im Vergleich zu Zellen des Wildtypstammes AX2. Eine Zunahme des Zellvolumens aufgrund einer modifizierten Pinozytoserate und einer gleichzeitig verminderten axenischen Wachstumsrate wurden ebenfalls beobachtet. Zudem wurde als Reaktion auf einen Nahrungsmangel die multizelluläre Entwicklung nicht induziert (Winckler *et al.*, 2001).

In der Arbeit von Lucas *et al.* (2009) wurde gezeigt, dass CbfA einige Gene reguliert, die an der Phagozytose beteiligte Proteine codieren. Ob CbfA ebenfalls an der Pinozytose beteiligte Gene beeinflusst oder ob dies eine Folge der verminderten Phagozytoserate ist, bleibt noch zu klären.

Weitere Studien des Stammes JH.D im Hinblick auf verschiedene Entwicklungsmarker zeigten, dass beim Hungern der Zellen eine Induktion von entwicklungsrelevanten Genen ausblieb. Insbesondere die basale Transkriptions-Aktivität des *acaA*-Genes schien in der Suppressionsmutante zu fehlen. Dies resultierte schließlich in einer Beeinträchtigung der multizellulären Entwicklung. Erst durch die Zugabe von zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP), ektopisch exprimiertes CbfA, der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA-C) oder der Adenylzyklase A wurde der Phänotyp zum Teil geheilt (Winckler *et al.*, 2001, Siol *et al.*, 2006a). Weiterführende Analysen zeigten daraufhin, dass CbfA *in vitro* den Promotor des *acaA*-Genes bindet und somit für die Transkriptions-

aktivität des Genes und der Induktion der Entwicklungsphase verantwortlich sein könnte (Siol *et al.*, 2006a).

Im Stamm JH.D wurden weiterhin verringerte Transkriptmengen der Plus- und der Minus-Strang-RNA des Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A anhand von *Northern-Blot*-Analysen festgestellt (Beck *et al.*, 2002). Eine Komplementation durch ein Proteinderivat der carboxy-terminalen Domäne von CbfA im Stamm JH.D wurde anschließend der Transkriptlevel des Retrotransposons wieder hergestellt (Jennes, 2006). Dies deutete darauf hin, dass die Funktion der CTD von CbfA für die Transkriptions-Aktivität beide Stränge des Retrotransposons ausreichend ist.

3.2 Die epigenetische Genregulation verschiedener Retrotransposons durch CbfA

Aufgrund von *Northern-Blot*-Analysen und Genexpressionsstudien vorangegangener Arbeiten besteht zunehmend die Vermutung, dass in Abhängigkeit der CbfA-Expression die Transkriptmenge des Retrotransposons TRE5-A reguliert wird. Dass neben diesem Retroelement auch weitere transposable Elemente in ihrer Transkription beeinflusst sein könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Um der Hypothese nachzugehen, wurden quantitative *Real-Time*-PCR-Messungen (qRT-PCR) von TRE5-A und anderer Retrotransposons vergleichend zwischen vegetativ wachsenden Zellen des Wildtypstammes AX2 und der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D durchgeführt.

Dies wurde durch eine Komplementation des CbfA-Mangels im Suppressionstamm JH.D durch rekombinant in die Zellen eingebrachten CbfA anschließend überprüft. Dieser Komplementationsstamm war durch die Transformation des Plasmides pPB4c in JH.D-Zellen erstellt worden. Das resultierende Protein rCbfA wurde als CbfA-Derivat von Aminosäuren 2 bis 998 exprimiert und entsprach fast vollständig dem CbfA-Wildtyp (Beck, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem ein weiteres CbfA-Derivat für Komplementationsanalysen eingesetzt. Durch die Transformation des Plasmides pPT132 Cmbf1-2 in JH.D-Zellen konnte ein Fusionsprotein aus dem Grün fluoreszierenden Protein (GFP) und der Carboxy-terminalen Domäne (CTD) CbfAs von Aminosäure 724 bis 998 (GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸) exprimiert werden. Durch dieses, als GFP-CTD bezeichnete Protein, wurde die regulatorische Funktion ohne die JumonjiC-Domäne, den zwei Zinkfingermotiven und dem Hauptteil der Asparagin-reichen Domäne in Bezug auf die Transposonexpression analysiert. Diese Messungen ermöglichten außerdem die quantitative Verifizierung der Ergebnisse aus den Dissertationsarbeiten von Beck (2002)

Ergebnisse

und Jennes (2006), in denen durch *Northern-Blot*-Analysen erste Hinweise auf eine Regulation der Transkriptmengen von TRE5-A durch die CTD von CbfA erbracht wurden.

In Abbildung 13 wird ein struktureller Überblick der analysierten Retrotransposons und der in der qRT-PCR amplifizierten Bereiche gegeben. Die für die qRT-PCR verwendeten Primerpaare sind im Anhang aufgeführt.

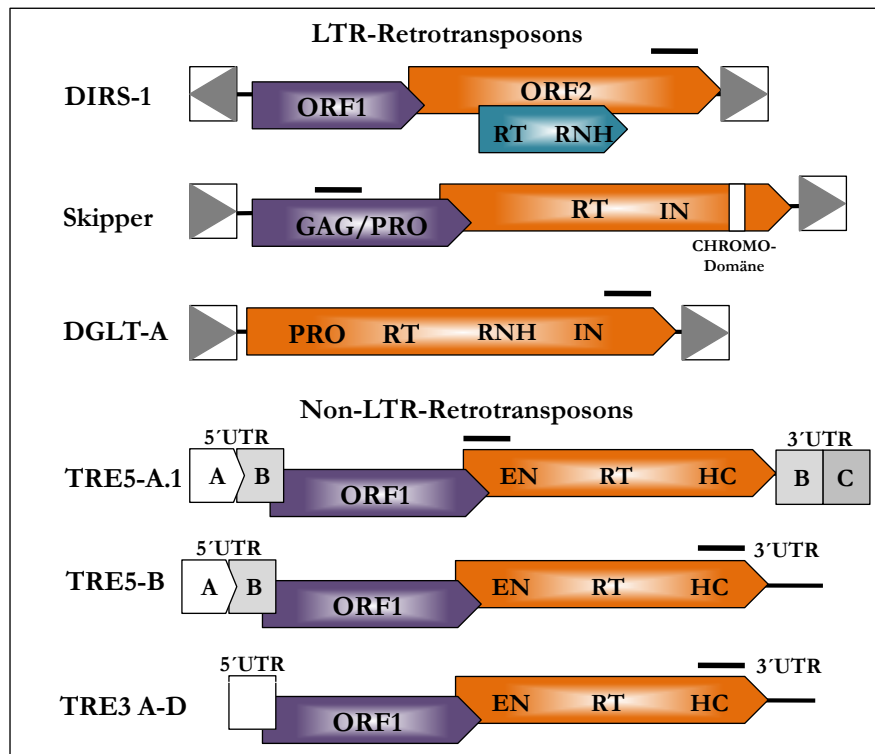


Abbildung 13: Strukturen verschiedener Retrotransposons. Graue Dreiecke: Orientierung der LTR-Sequenz; schwarzer Balken: in der qRT-PCR amplifizierte Regionen; RNH: RNase-H-Domäne; CHROMO: *Chromatin-Organisation-Modifier-domain*; EN: Endonuklease-Domäne; RT: reverse Transkriptase-Domäne; HC: Histidin/Cystein-reiche Domäne; 5'UTR und 3'UTR: modularer Aufbau von untranslatierten Regionen der TREs.

Für den Wildtypstamm AX2 und die beiden Komplementationstämmen wurden an jeweils drei unabhängigen Kulturreplikaten die Transkriptmengen verschiedener Retrotransposons von *D. discoideum* in Bezug zu JH.D bestimmt. Zusätzlich zu dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A.1 wurden weitere Mitglieder der TRE-Familien TRE5 und TRE3 sowie die LTR-Retrotransposons DIRS-1, Skipper und DGLT-A in die Experimente mit einbezogen. Die Elemente TRE5-C, TRE3-B und TRE3-D wurden nicht in der Analyse untersucht, da eine Expression dieser Elemente im Stamm AX2 nicht nachgewiesen werden konnte (Abbildung 14).

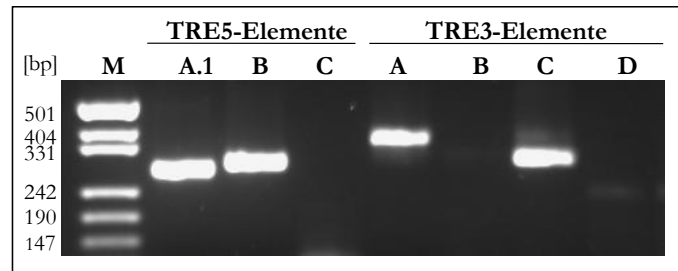


Abbildung 14: Analyse der Transkription von TREs.

Die Berechnung der Expressionsregulation der Retrotransposons ist nach der modifizierten „delta-delta-CT“-Methode von Pfaffl (2001) jeweils auf JH.D als Kontrolle bezogen worden. Somit war eine Gegenüberstellung der durch die Komplementationen hervorgerufenen Regulationen zur Wildtyp-CbfA-Regulation möglich. Zur Standardisierung wurde das Transkript des Gens *catA* verwendet, da dieses zwischen den genannten Stämmen nicht differenziell exprimiert wurde. Befanden sich die berechneten Werte der Regulationen zwischen den Schwellenwerten 0,66 und 1,5, wurde keine signifikante Änderung in der Expression angenommen. Kleinere Werte wiesen auf negative, größere Werte auf positive Regulationen durch CbfA und seine Derivate hin. Die gemittelten Werte wurden in einem Diagramm in der Abbildung 15 dargestellt.

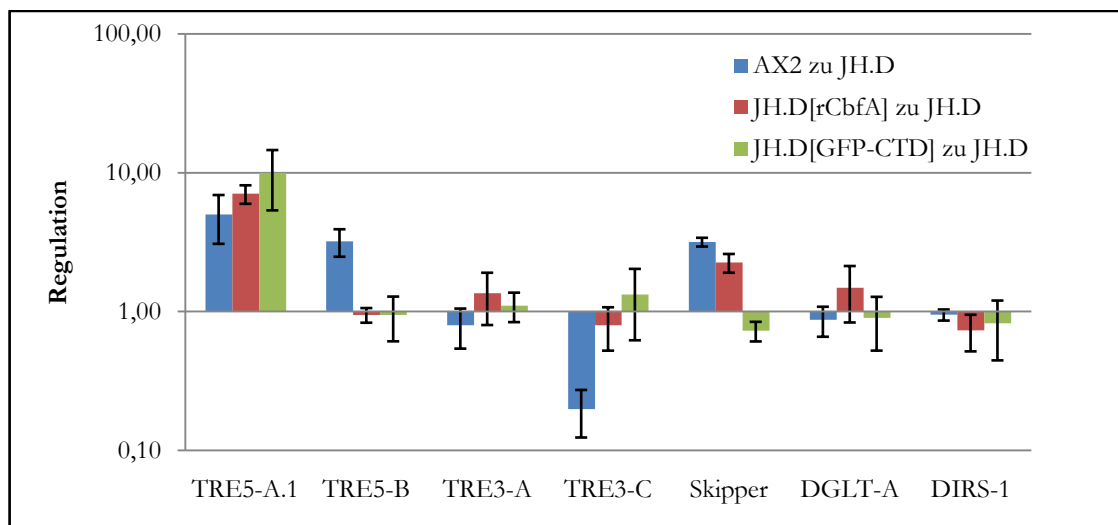


Abbildung 15: Regulatorischer Einfluss von Wildtyp-CbfA (AX2), des CbfA²⁻⁹⁹⁸-Derivats (rCbfA) und des GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ (GFP-CTD) auf die Expression von Retrotransposons. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung.

Eines der am intensivsten untersuchten Retrotransposons von *Dictyostelium discoideum* ist TRE5-A mit dessen Subtypen TRE5-A.1, TRE5-A.2 und TRE5-A.3. Um eine Regulation durch CbfA für die Elemente TRE5-A.1 und TRE5-A.2 zu erfassen, wäre eine Amplifikation des ORF1 notwendig, da dieser Leserahmen in den genannten TRE5-A-Elementen zu finden ist. Die Regulation des „ABC-Minielementes“ TRE5-A.3 war nicht analysiert worden, da es nur modulare Einheiten besitzt (Winckler *et al.*, 2002). Aus

Ergebnisse

unbekannten Gründen konnte die reverse Transkription des ORF1 jedoch nicht realisiert werden. Die qRT-PCR von TRE5-A erfolgte daher durch eine Amplifikation des ORF2. Dieser ORF hingegen ist in TRE5-A.2 teilweise und in TRE5-A.3 vollständig deletiert. Die Regulationen durch CbfA oder dessen Derivate konnten somit nur für TRE5-A.1 erfasst werden.

Die Expression des TRE5-A.1-Elementes war im Wildtypstamm AX2 fünffach höher als in der CbfA-Mutante ($5,00 \pm 1,92$; $n=3$). Durch die Komplementation des JH.D-Stammes mit dem Protein rCbfA stieg die Expression sogar auf den siebenfachen Wert ($7,05 \pm 1,07$; $n=3$). Die C-terminale Domäne von CbfA war allein in der Lage, das Transkriptionsniveau des Retrotransposons in JH.D im Vergleich zu AX2 wieder herzustellen. Durch die Überexpression der CTD wurde die TRE5-A.1-Expression im Vergleich zur CbfA-Mutante um das 10-fache erhöht ($9,98 \pm 4,62$; $n=3$). Die Resultate der qRT-PCR-Messungen bestätigen die *Northern-Blot*-Analysen aus vorangegangenen Arbeiten über TRE5-A (Abbildung 10; Beck, 2002; Jenness, 2006).

Die Expression von TRE5-B wurde ebenfalls durch das Wildtyp-Protein dreifach positiv reguliert ($3,20 \pm 0,72$; $n=3$). Jedoch konnte durch die Komplementationsproteine rCbfA und GFP-CTD in JH.D diese positive Regulation nicht gezeigt werden. Das Protein rCbfA schien für dieses Retrotransposon CbfA in seiner Funktion im Stamm JH.D nicht zu komplementieren.

TRE3-A wurde in keiner Weise durch CbfA reguliert.

Für das zweite untersuchte, der TRE3-Familie angehörige Retrotransposon TRE3-C, war eine Regulation von $0,2 \pm 0,07$ ($n=3$), d.h. eine Überexpression in der CbfA-Mutante, zu beobachten. Die Expression dieses transposablen Elementes wurde fünffach durch CbfA vermindert. Dies konnte mit den CbfA-Derivaten rCbfA und GFP-CTD nicht festgestellt werden.

Das LTR-Retrotransposons Skipper wurde durch CbfA dreifach positiv reguliert ($3,17 \pm 0,23$; $n=3$). Dies konnte in einem ähnlichen Umfang durch die Komplementation von JH.D mit dem Protein rCbfA durch eine zweifache Erhöhung gemessen werden ($2,25 \pm 0,35$; $n=3$). Hingegen stellte für dieses Retrotransposon die autonome C-terminale Domäne das Expressionsniveau nicht wieder her. Deren Regulationswert von $0,73 \pm 0,12$ ($n=3$) verwies auf keine veränderte Transkription im Vergleich zur *cbfA*-Suppressionsmutante.

Die Interpretation der Daten für DGLT-A und DIRS-1 sind ähnlich zu TRE3-A zu sehen. Die Regulationen befanden sich innerhalb der Schwellenwerte 0,66 und 1,5. CbfA besaß somit keinen Einfluss auf die Expression dieser LTR-Retrotransposons.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die CbfA-abhängige Beeinflussung von Transkriptmengen anhand von qRT-PCR-Messungen bestimmt werden konnte. CbfA scheint die Retrotransposons TRE5-A.1 und Skipper zu regulieren, wobei die Funktion der C-terminalen Domäne von CbfA allein ausreichend ist, um die Transposon-RNA von TRE5-A.1 zu beeinflussen.

Durch die Regulation der Transkriptmengen von TRE5-A.1 und Skipper besteht die Vermutung, dass CbfA an der Inaktivierung der Retrotransposons über *post-transcriptional gene-silencing* (PTGS) beteiligt ist. Es existiert jedoch auch die Möglichkeit, dass CbfA Gene verschiedener RNA-Interferenz-Proteine beeinflusst und dadurch eine Regulation der Transkriptmenge von Skipper und TRE5-A hervorruft.

In der Arbeit von Annika Bilzer (Bilzer, 2010) wurde die CbfA-abhängige Genregulation einiger RNAi-Proteine untersucht. Quantitative Messungen zwischen AX2 und JH.D der Genexpression für die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen RrpA, RrpB und RrpC sowie der putativen RNA-Helikase Helf und RNase III konnten keine Regulation durch CbfA aufdecken.

Die Beantwortung der Frage, inwieweit die Aktivität von TRE5-A.1 durch RNA-Interferenz oder durch DNA-Methylierung, wie etwa bei Skipper (Kuhlmann *et al.*, 2005), stillgelegt wird, kann zusätzlich einen Hinweis auf die Retrotransposon-Regulation geben. Ferner wird in diesem Zusammenhang die Transkriptionsaktivierung durch eine Histon-Methylierung untersucht. Die Histon-Methyltransferase Set1 von *D. discoideum* methyliert den Lysinrest an Position 4 von Histon H3 und trägt dadurch zu einer Transkriptionsaktivierung bei (Chubb *et al.*, 2006).

Für die Analyse der Transkriptmengen von TRE5-A.1, DIRS-1 und Skipper fanden in Abhängigkeit der RNAi-Proteine RrpA, RrpB, RrpC, Helf sowie der DNA-Methyltransferase DnmA und der Histon-Methyltransferase Set1 quantitative Messungen an *Knock-out*-Stämmen vergleichend zum Wildtypstamm AX2 statt. Es wurden die gleichen Primerpaare für die Retrotransposons wie in der vorhergehenden Quantifizierung eingesetzt. Die Messungen wurden an drei unabhängigen Kulturreplikaten durchgeführt. Für die Standardisierung wurde das Gen *gpdA*, das für die Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) codiert, verwendet. Alle Berechnungen nach der modifizierten „*delta-delta-CT*“-Methode (Pfaffl, 2001) bezogen sich auf die *Knock-out*-Stämme als Kontrolle und wurden als gemittelte Werte im Diagramm der Abbildung 16 dargestellt. Als Schwellenwerte wurden, wie im vorigen Kapitel, die Werte 0,66 und 1,5 betrachtet. Kleinere Werte deuteten auf eine negative, größere Werte auf eine positive Regulation bzw. geringere oder erhöhte Transkriptmengen hin.

Ergebnisse

Für das Element TRE5-A.1 ist eine fast zweifache Reduktion der RNA-Menge durch die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen RrpA und RrpC zu erkennen ($0,52 \pm 0,08$ bzw. $0,53 \pm 0,08$; $n=3$). Hingegen ist eine Veränderung der Transkriptmenge des Retrotransposons durch die Proteine RrpB und HelF nicht zu verzeichnen. Eine Regulation von 1,54 ($\pm 0,09$; $n=3$) konnte durch DnmA festgestellt werden. Durch Set1 wurde die Transkriptmenge erhöht, jedoch lag die 1,47-fache Regulation ($\pm 0,22$; $n=3$) innerhalb des Grenzwerts. Die RNA-Menge von TRE5-A.1 scheint durch wesentliche Bestandteile der RNAi-Maschinerie beeinflusst zu werden.

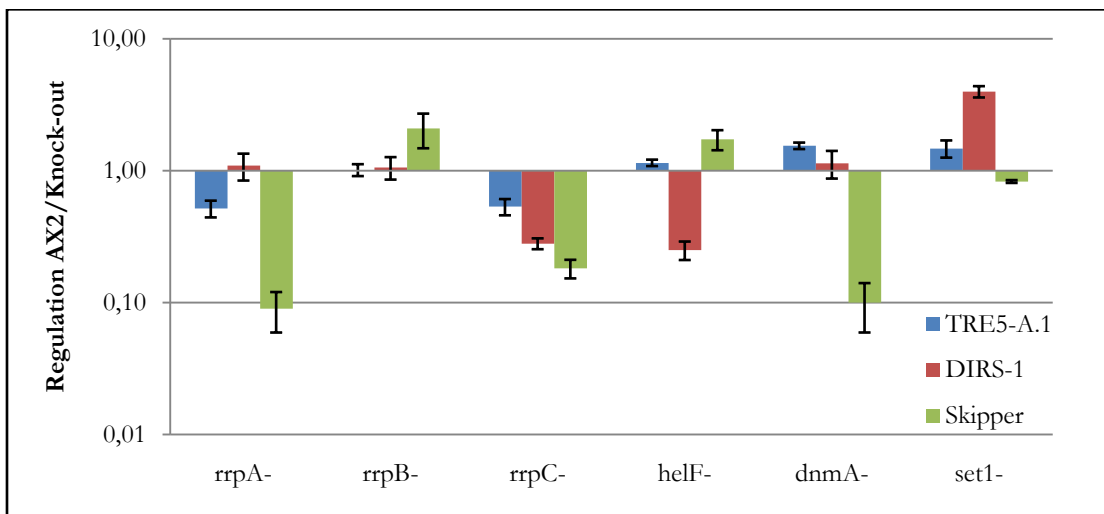


Abbildung 16: Expressionsregulation verschiedener Transposons zwischen AX2 und Knock-out-Stämmen. Dargestellt sind Mittelwerte und deren Standardabweichung.

Die RNA-Menge des LTR-Retrotransposons DIRS-1 wurde mit einem 3,5-fach verminderten Wert durch RrpC und einem vierfach verminderten Wert durch die Helikase HelF reguliert ($0,28 \pm 0,03$ bzw. $0,25 \pm 0,04$; $n=3$). Hingegen scheinen RrpA, RrpB und DnmA für DIRS-1 keine Repressoren darzustellen. Die Histon-Methyltransferase Set1 erhöhte die Expressionsaktivität nahezu um das Vierfache und stellt für dieses transposable Element einen Aktivator dar ($3,97 \pm 0,39$; $n=3$).

Eine Regulation der Aktivität von Skipper wurde in vergleichenden qRT-PCR-Messungen durch die RNAi-Proteine RrpA und RrpC festgestellt, welche die Transkriptmengen des Retrotransposons um das 11-fache bzw. um das 5,5-fache verminderten ($0,09 \pm 0,03$ bzw. $0,18 \pm 0,03$; $n=3$). Dagegen ist die zweifach erhöhte Expression durch RrpB unverständlich, da eine Erhöhung der Transkriptmenge durch diese RNAi-Polymerase unwahrscheinlich scheint. Die Proteine HelF und Set1 beeinflussten die Skipper-Aktivität nicht. Die von DnmA vermittelte DNA-Methylierung führte zu einer Expressionshemmung. DnmA war in der Lage die Transkription von Skipper um das 10-fache zu reduzieren ($0,1 \pm 0,04$; $n=3$). Hier könnte ein Zusammenhang von DNA-

Methylierung und *post-transkriptional gene silencing* für das analysierte Retrotransposon bestehen. Neben TRE5-A.1 und DIRS-1 wurde somit auch Skipper durch die RNAi-Maschinerie in seiner Aktivität negativ reguliert.

3.3 Die CbfA-vermittelte Genregulation – Eine Untersuchung mittels Chromatin-Immunopräzipitationen

Dass CbfA nicht nur auf die Expression verschiedener Retrotransposons Einfluss nimmt, sondern auch eine große Anzahl von Genen reguliert, konnte in der Veröffentlichung von Lucas *et al.* (2009) anhand einer cDNA-Microarray-Analyse gezeigt werden. In dieser Arbeit sind ca. 6.000 Gentranskripte untersucht worden, von denen 162 durch CbfA in ihrer Transkription aktiviert oder reprimiert wurden. Unter Berücksichtigung einer mindestens vorhandenen 1,5-fachen Regulation wurden 80 Gene positiv und 82 Gene negativ in ihrem Expressionslevel durch CbfA verändert.

Um genauer die Regulationen einzelner Gene zu analysieren und nähere Untersuchungen zur Funktion der C-terminalen Domäne von CbfA durchzuführen, sind die zwischen AX2 und JH.D differentiell exprimierten 162 Gene aus dem *Array*-Experiment einer Clusteranalyse (GeneSpring 7.2, Agilent) unterzogen worden (Lucas *et al.*, 2009). Diese Cluster stellen sechs verschiedene Modi der CbfA-Genregulation in Verbindung mit der Expression von GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ dar (Tabelle 2). Dabei wurde jedes Gen aufgrund dessen Reaktion auf die C-terminale Domäne in der JH.D-Umgebung in einem von sechs Clustern einsortiert. Die in ihrer Expression durch CbfA aktivierten 80 Gene wurden den Cluster I bis III zugeordnet, während in Cluster IV bis VI die durch CbfA reprimierten 82 Gene eingegliedert wurden.

Tabelle 2: Regulationseffekt von GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸. Expression von 162 CbfA-regulierten Genen in JH.D-Zellen, die das Derivat GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ exprimieren. Tabelle nach Lucas *et al.* (2009).

Definition	Cluster	Genanzahl	Reaktion
AX2>JH.D	I	37	CbfA-CTD zeigt keinen Effekt in JH.D
	II	8	CbfA-CTD verstärkt den Effekt von JH.D
	III	35	CbfA-CTD kehrt den Effekt in JH.D um
AX2<JH.D	IV	4	CbfA-CTD verstärkt den Effekt von JH.D
	V	60	CbfA-CTD kehrt den Effekt in JH.D um
	VI	18	CbfA-CTD zeigt keinen Effekt in JH.D

In der Veröffentlichung von Lucas *et al.* (2009) konnte gezeigt werden, dass die CTD allein in der Lage ist, Gene von Cluster III und V in gleicher Weise wie Gesamt-CbfA zu regulieren. Gene der Cluster II und IV jedoch wurden durch GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ in dem JH.D-Effekt verstärkt. Das bedeutet, das kleinere CbfA-Derivat-Protein verdrängt in der

Ergebnisse

Mutante JH.D das noch in geringer Menge vorliegende Volllängenprotein an der DNA. Die noch vorhandene, schwache Regulation durch CbfA wurde dadurch vollständig unterbunden. Dahingehend konnten Gene der Cluster I und VI nur von Gesamt-CbfA beeinflusst werden, da die CTD allein keinen regulatorischen Einfluss erkennen ließ. Für die Gene der Cluster I, II, IV und VI wurde vermutet, dass andere Proteindomänen CbfAs für die Genexpression essentiell sind. Da die Annahme besteht, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen gleich oder ähnlich exprimierten Genen vorherrscht, sind für weitere Untersuchungen repräsentativ für jedes Cluster nur einige Gene ausgewählt worden (Farbrother *et al.* 2006; Na *et al.* 2007).

Tabelle 3: Regulationsvergleich der repräsentativen Gene. Cluster I-III: CbfA-vermittelte Transkriptionsaktivierung; Cluster IV-VI: CbfA-vermittelte Transkriptionsreprimierung; grau unterlegte Gene: in einer Chromatin-IP-Analyse amplifiziert und elektrophoretisch dargestellt in Abbildung 18; Daten aus Lucas *et al.*, (2009).

Definition	Cluster	DDB ID	cDNA-Microarray
AX2>JH.D	I	DDB_G0277473	2,120
	I	DDB_G0277403	1,671
	II	DDB_G0281609	1,727
	III	DDB_G0286953	2,818
	III	DDB_G0282815	6,091
	III	DDB_G0274181	3,529
AX2<JH.D	IV	DDB_G0292986	0,572
	V	DDB_G0279751	0,267
	V	DDB_G0277901	0,620
	VI	DDB_G0267528	0,373
	VI	DDB_G0270836	0,597

In Tabelle 3 wurden diese Gene mit ihren Regulationen in Abhängigkeit des CbfA-Proteins aufgelistet. Die Schwellenwerte von 0,66 für eine negative bzw. 1,5 für eine positive Regulation wurden jedoch rein empirisch festgelegt. Eine Orientierung der Grenzzsetzung konnte durch die Veröffentlichung von Mane *et al.* (2009) und Wall *et al.* (2009) erhalten werden.

Um einen direkten Beweis der CbfA-vermittelten Genregulation zu erbringen, ist in der vorliegenden Arbeit eine *Crosslink*-Chromatin-Immunoprecipitation (XChIP) durchgeführt worden. In dem hier verwendeten Experiment wurde eine JH.D-Kultur mit den Plasmiden pGEM-cbfA03 und pISAR doppeltransformiert, wodurch bei erfolgreicher Transformation eine Neomycin-Geneticin-Resistenz vorhanden war. Parallel wurde dadurch das Fusionsprotein NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰, bestehend aus dem TAP-tag, dem gelb fluoreszierenden Protein (*Yellow Fluorescent Protein* = YFP) und dem CbfA-Derivat von Aminosäure 61 bis 1000, exprimiert. Das CbfA-Derivat umfasst vollständig das Exon 2 des 62

Wildtyp-CbfAs. Es wurde auf ein TAP-markiertes Fusionsprotein für die Chromatin-IP zurückgegriffen, da mit Hilfe der monoklonalen Antikörper 3H7 und 7F3, die entweder ein Epitop in der JmjC-Domäne oder der CTD erkannten, keine Präzipitationen erreicht wurden (Abbildung 17).

Für die Herstellung dieser Antikörper dienten denaturierte CbfA-Derivate als Antigene (Winckler *et al.*, 2001; Siol *et al.*, 2006a). Vermutlich erfolgte keine Erkennung der Epitope für das native Protein, wie es in der Chromatin-Immunopräzipitation vorlag.

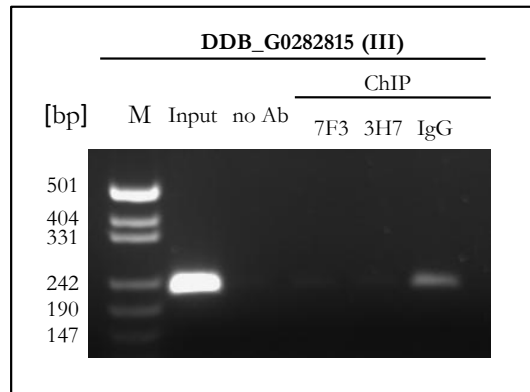


Abbildung 17: Chromatin-Immunopräzipitation der Promotorsequenz von DDB_G0282815 mit zwei Antikörpern gegen CbfA und mit IgG gegen den TAP-tag des Fusionsproteins NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰. M: DNA-Marker (pUC19 MspI); Input: entspricht 2 % der in ChIP eingesetzten Chromatin-CbfA-Probe; no ChIP: kein Antikörper verwendet; ChIP: Chromatin-IP mit α -CTD, α -JmjC und IgG gegen TAP-tag.

Charakteristisch für das ChIP-Verfahren ist das Fixieren der Protein-DNA-Bindung *in vivo* mit Hilfe von Paraformaldehyd und der Zerkleinerung von genomischer DNA durch Ultraschall (Hecht & Grunstein, 1999). Die Protein-Chromatin-Komplexe konnten mit Hilfe des TAP-tags an IgG-Agarose immobilisiert werden (ChIP-Probe). Als Negativkontrolle wurde eine Agarose, ohne gekoppeltes Immunglobulin G, verwendet (no ChIP-Probe). Nach anschließendem Waschen und Eluieren der Komplexe konnte die CbfA-Chromatin-Bindung gelöst und die präzipitierte genomische DNA aus dem Gemisch extrahiert werden. An der Positiv- und der Negativprobe wurden parallel promotornahe Bereiche ausgewählter Gene amplifiziert. Die Resultate sind in Abbildung 18 dargestellt. Als Negativkontrolle des ChIP-Verfahrens wurde das Gen *gpdA* verwendet.

In der folgenden Darstellung sind gemeinsam die Gene auf ein Gel aufgetragen worden, die vermutlich in Abhängigkeit der funktionellen Domänen von CbfA reguliert werden. Das bedeutet, Gene der Cluster III und V werden allein durch die C-terminalen Domäne reguliert, während Gene aus Cluster II und IV durch die CTD jedoch nur in Verbindung mit einer weiteren Proteindomäne von CbfA reguliert werden (Lucas *et al.*, 2009). In diesem Fall würden die JmjC-Domäne oder die Zinkfinger motive eine wesentliche Rolle

Ergebnisse

bei der Genregulation spielen. Gene der Cluster I und VI hingegen werden unabhängig von der CTD in ihrer Genexpression beeinflusst.

Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, sind alle Promotoren der repräsentativen Clustergene durch CbfA präzipitiert worden. Neben den durch die CTD allein regulierten Gene aus Cluster III und V wurden auch die Promotoren der anderen Clustergene durch CbfA gebunden. Da das Gen *gpdA* nicht an der präzipitierten genomischen DNA amplifiziert wurde, war davon auszugehen, dass mittels der Chromatin-IP nur spezifisch durch CbfA gebundene DNA-Bereiche amplifiziert werden konnten.

Die in Tabelle 3 aufgeführten CbfA-vermittelten Genregulationen aus dem cDNA-*Microarray* wurden durch diesen *in vivo*-Beweis bestätigt. CbfA hat die amplifizierten DNA-Sequenzen gebunden und könnte somit eine Transkriptionsregulation vermitteln.

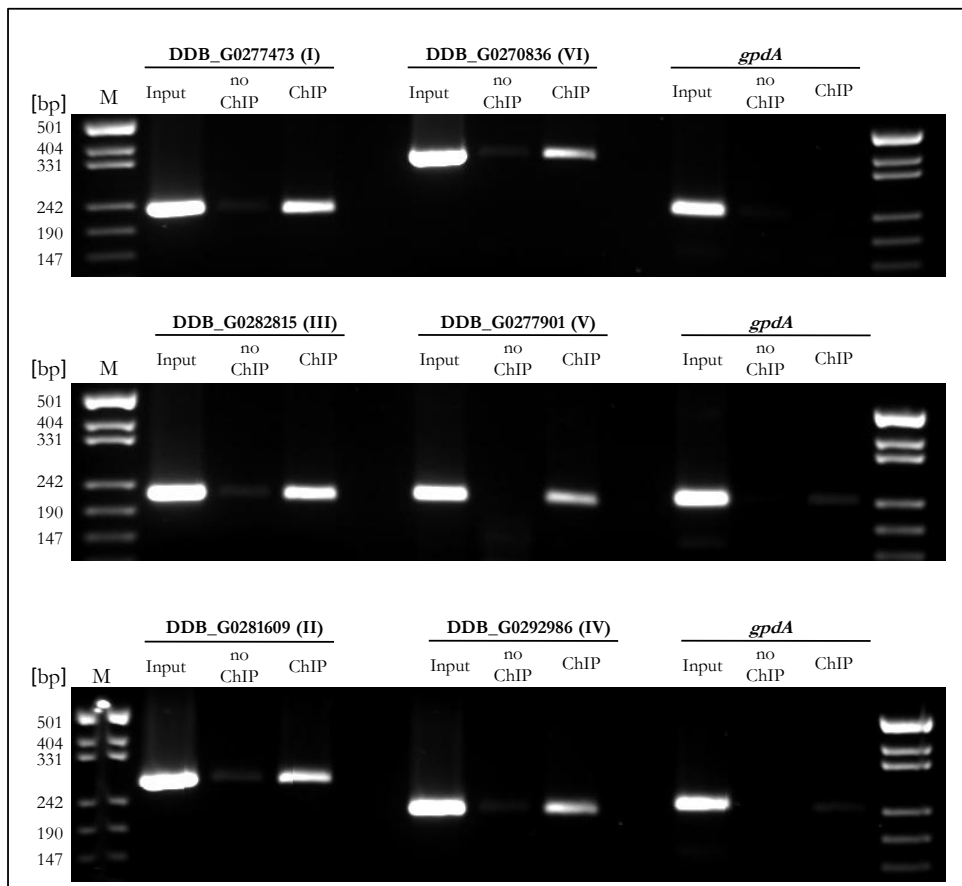


Abbildung 18: Gelelektrophorese von amplifizierten Genen aus einer CbfA-ChIP. Dargestellt sind repräsentative Clustergene: oben: Cluster I und VI; mittig: Cluster III und V; unten: Cluster II und IV; M: DNA-Marker (pUC19 MspI); Inputbande entspricht 2 % der in ChIP eingesetzten Chromatin-CbfA-Probe; *gpdA* als Negativkontrolle der DNA-Bindung durch CbfA

Um die Ergebnisse der ChIP zu überprüfen, wurde die DNA-Menge des Inputs, der ChIP- und der no ChIP-Probe mit Hilfe der quantitativen *Real-time* PCR analysiert. Eine Möglichkeit, diese Daten auszuwerten, kann durch die Normalisierung der ChIP-Probe

gegenüber dem Hintergrundsignal erfolgen. Dafür wurde die Zunahme der ausgewählten präzipitierten DNA-Sequenzen gegenüber ihrer Negativprobe berechnet:

$$\text{Vielfache Anreicherung} = 2^{(Ct^{\text{no ChIP}} - Ct^{\text{ChIP}})}$$

Im Diagramm der Abbildung 19 wird diese Auswertung für die Clustergene und *gpdA* dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die analysierten Clustergene gegenüber der Negativprobe, in der keine Bindung des CbfA-Fusionsproteins an Agarose stattgefunden hat, eine mindestens fünffache Anreicherung erfahren haben. Sogar eine über 20-fach erhöhte Präzipitation konnte für die analysierten Gene aus Cluster I, III und V berechnet werden. Das Kontrollgen *gpdA* hingegen wurde weniger als dreifach angereichert. Die Zunahme des ChIP-Signals gegenüber dem Hintergrundsignal bestätigte somit die in Abbildung 18 amplifizierte DNA-Bereiche.

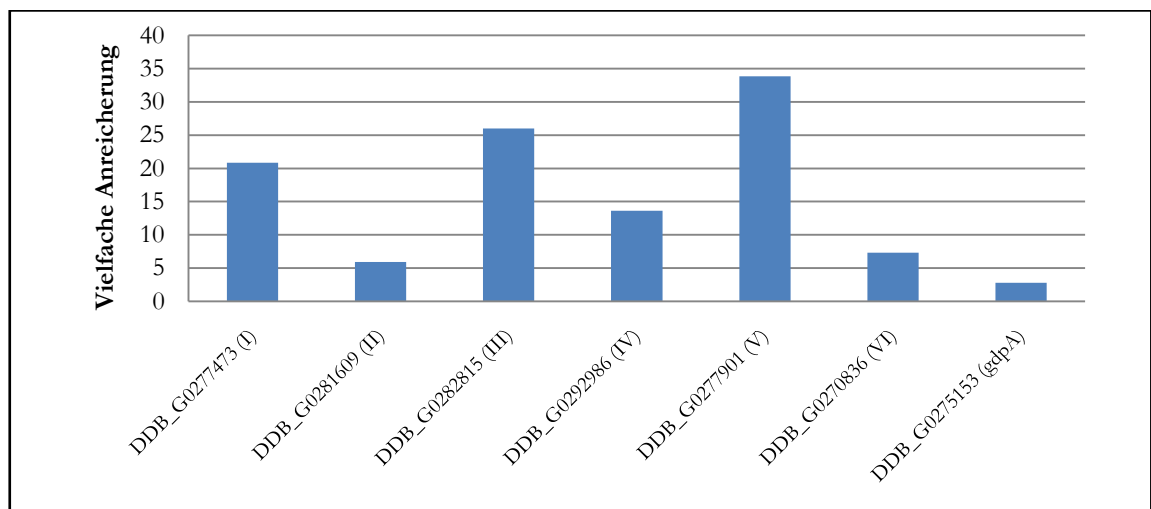


Abbildung 19: Anreicherung der Clustergensequenzen gegenüber ihrer Negativprobe.

Eine weitere Möglichkeit ChIP-qPCR-Daten auszuwerten, besteht darin, den Anteil an genomischer, durch CbfA präzipitierter DNA bezogen auf den Input (100 %) nach folgender Formel zu berechnen:

$$\% \text{ Input} = 100 \times 2^{(Ct^{\text{Input}} - Ct^{\text{ChIP}})}$$

Zusätzlich wurde die gleiche Auswertung für die negative ChIP-Probe durchgeführt. Beide Berechnungen sind in der folgenden Darstellung für jedes Clustergen vergleichend abgebildet (Abbildung 20). In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass alle promotornahen Bereiche der untersuchten Clustergene durch deren Interaktion mit CbfA gegenüber ihrer Negativprobe angereichert wurden. Die stärksten Präzipitationen erfolgten für Gene der Cluster I, III und V. Die Promotoren der Gene von Cluster II, IV und VI konnten ebenfalls durch CbfA, wenn auch weniger stark, gebunden werden. Im Vergleich zum Gen

Ergebnisse

gpdA war für alle untersuchten Clustergene eine höhere Anreicherung gemessen worden. Diese Analyse bestätigte ebenfalls die in Abbildung 18 dargestellten Amplifikationen.

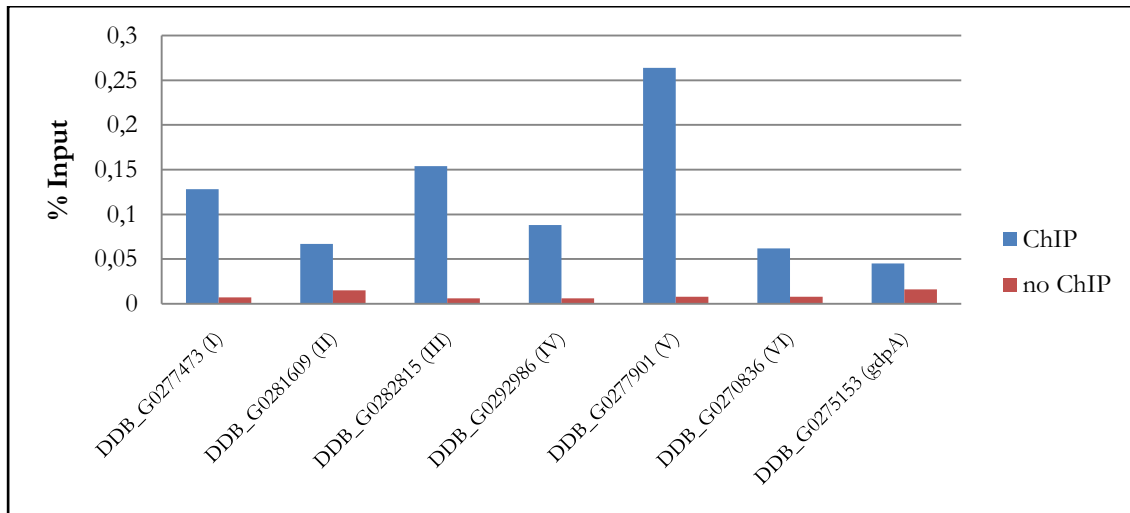


Abbildung 20: Prozentuale Anreicherung von genomischer DNA mittels CbfA-ChIP gegenüber dem Input. Blauer Balken: durch CbfA präzipitiertes Clustergen. **Roter Balken:** ohne CbfA-Bindung präzipitiertes Clustergen. *GpdA*: Negativkontrolle des ChIP-Verfahrens.

In Bezug zum Inputgehalt muss das Resultat der CbfA-ChIP jedoch kritisch betrachtet werden. Die Menge der durch CbfA gebundenen genomischen DNA entsprach für alle untersuchten Gene weniger als 0,5 %. Obwohl ausgewählte promotornahe DNA-Bereich durch CbfA im Vergleich zur Negativprobe präzipitiert wurden, wird anhand der Inputberechnung deutlich, dass deren Anteil sehr gering ausfällt. Diese Streuung ist vermutlich auf die geringe Effizienz des TAP-tags zurückzuführen, der zur Präzipitation des Protein-DNA-Komplexes verwendet wurde. Eine effizientere Präzipitations-möglichkeit stand nicht zur Verfügung.

3.4 *In vivo*-Nachweis der Bindung des *acaA*-Promotors durch CbfA

In der Arbeit von Siol *et al.* (2006a) konnte *in vitro* gezeigt werden, dass CbfA einen spezifischen Bereich des *acaA*-Promotors bindet und ein Regulator dieses Genes und der Expression der Adenylylzyklase, welches in der multizellulären Entwicklung von *Dictyostelium discoideum* eine zentrale Rolle spielt, darstellen könnte. Durch das Verfahren der Chromatin-Immunopräzipitation bestand die Möglichkeit, diese DNA-Protein-Interaktion an sich entwickelnden Zellen *in vivo* nachzuweisen.

Für die Gegenüberstellung der Wachstums- und Entwicklungsphase wurden von einer transformierten JH.D-Kultur, die das Fusionsprotein NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ exprimierte, vegetativ wachsende Zellen (t0) und, nach zweistündiger Hungerphase und anschließenden vierstündigen Pulsen mit cAMP, sich entwickelnde Zellen (t6) analysiert. Zum Nachweis der allgemeinen genetischen Transkriptionsaktivität der Zellen dieser Kultur konnten zu

den unterschiedlichen Zeitpunkten t0 und t6 durch Verwendung von Zelllysaten die mRNAs der Zellen mittels der reversen Transkriptase zu cDNA synthetisiert werden. Die entwicklungsrelevanten Gene *acaA* und *csaA* sowie das Gen *orfSGP* wurden anschließend unter Verwendung der konventionellen PCR amplifiziert und das Produkt auf einem Agarosegel dargestellt (Abbildung 21). Das Gen *orfSGP* wurde verwendet, da dessen Regulation durch CbfA anhand des cDNA-Microarrays und der ChIPs gezeigt wurde und daher als Positivkontrolle diente (Kapitel 3.3; Lucas *et al.*, 2009).

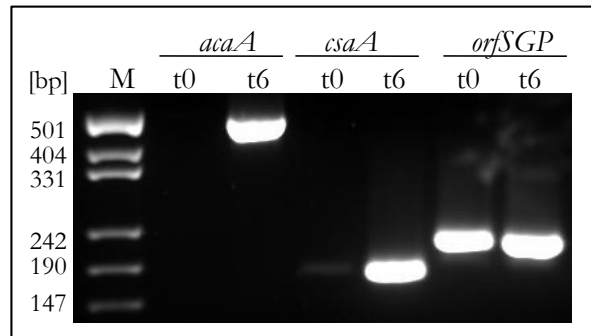


Abbildung 21: PCR-Produkte verschiedener Gene an vegetativen und sich entwickelnden *D. discoideum*-Zellen. M: DNA-Marker (pUC19 MspI); Expression der Gene *acaA*, *csaA* und *orfSGP* jeweils zum Zeitpunkt t0 und t6.

Während von *acaA* und *csaA* nur zum Zeitpunkt t6 RNA vorhanden war, zeigte das in beiden Phasen aktivierte Gen *orfSGP* eine Genexpression über den gesamten Zeitraum. Die Zellen der transformierten JH.D-Kultur waren durch das cAMP-Pulsen von dem vegetativen Wachstum in die multizelluläre Entwicklung übergegangen.

An dieser Kultur wurde jeweils in der vegetativen- und in der Entwicklungsphase eine Chromatin-Immunoprecipitation mittels dem TAP-tag des CbfA-Fusionsproteins durchgeführt. An der präzipitierten DNA konnte der Promotor des *acaA*-Genes und die 5'-Enden des Genes *gpdA* und *orfSGP* amplifiziert werden. Es war auf die 5'-Enden der zuletzt genannten Gene zurückgegriffen worden, da diese Bereiche gegenüber den Promotorbereichen spezifischer zu amplifizieren waren.

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass der Promotor des *acaA*-Genes nicht während der vegetativen Wachstumsphase, jedoch in der multizellulären Entwicklung, von CbfA gebunden wurde. Das 5'-Ende des *gpdA*-Genes interagiert zu keinem Zeitpunkt mit dem Transkriptionsfaktor, da es nicht amplifiziert wurde. Hingegen ging CbfA mit dem nahe dem 5'-Ende gelegenen Promotor von *orfSGP* in der vegetativen, wie auch in der Entwicklungsphase, eine DNA-Protein-Interaktion ein.

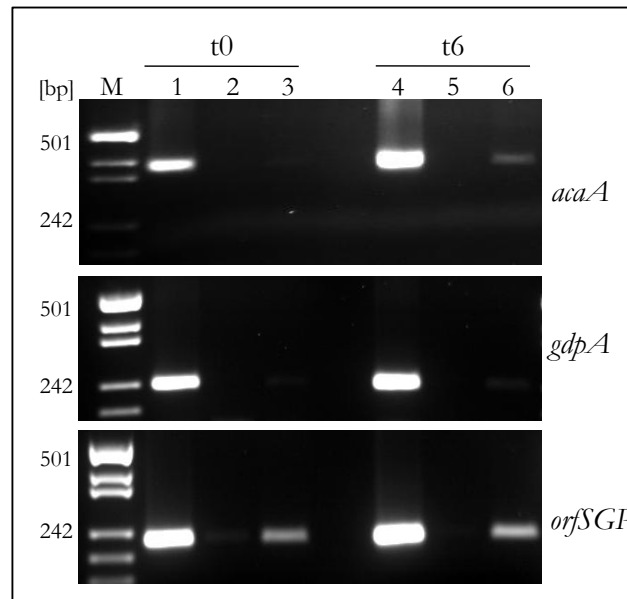


Abbildung 22: PCR-Produkte einer CbfA-ChIP von vegetativ wachsenden und sich sechs Stunden entwickelnden *D. discoideum*-Zellen. M: DNA-Marker (pUC19 MspI); Spur 1-3: vegetative Zellen: 1: Input 30 %; 2: no ChIP; 3: ChIP; Spur 4-6: mit cAMP gepulste Zellen: 4: Input 30 %; 5: no ChIP; 6: ChIP

Diese Aussagen wurden quantitativ durch qRT-PCR Messungen bestätigt und in Abbildung 23 dargestellt. Die Zunahme bzw. Abnahme an präzipitierter DNA von Zeitpunkt t0 zu t6 ist nach folgender Formel berechnet worden.

$$\text{Vielfache Anreicherung} = \text{Testgen } 2^{(\text{Ct}(t0) - \text{Ct}(t6))} / \text{gdpA } 2^{(\text{Ct}(t0) - \text{Ct}(t6))}$$

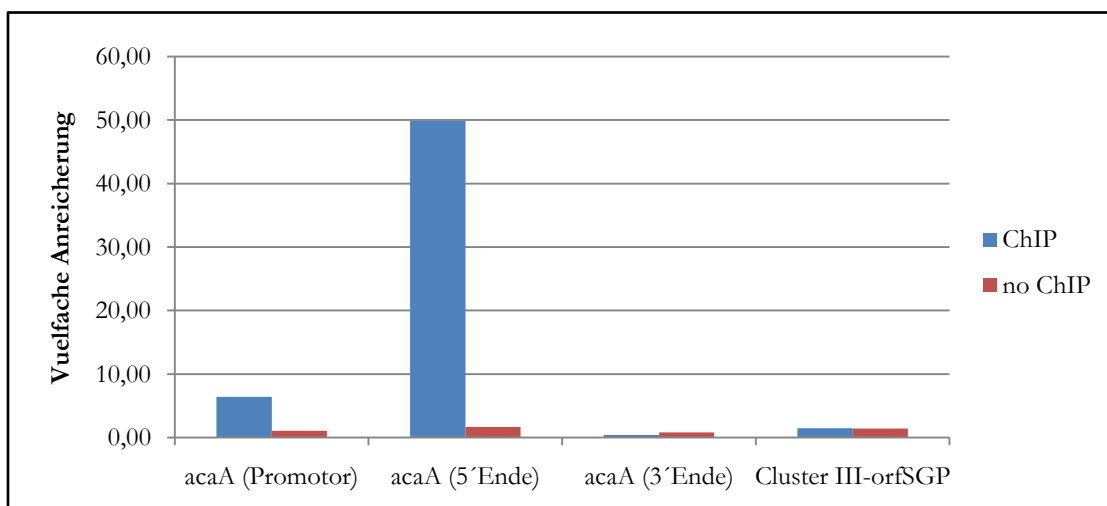


Abbildung 23: Berechnung der vielfachen Anreicherung an präzipitierter DNA von t0 zu t6.

Die analysierte Sequenz des *acaA*-Promotors ist im Vergleich von vegetativen zu sich entwickelnden Zellen 6,41-fach stärker präzipitiert worden. Eine weitere Messung des 5'-Endes des *acaA*-Gens zeigte eine 49,87-fach erhöhte DNA-Bindung, während das 3'-Ende 0,41-fach vermindert gebunden war. Die Menge der gebunden DNA des Genes *orfSGP* war mit einer Veränderung von 1,44 weitestgehend in der vegetativen- und der

Entwicklungsphase gleichbleibend. Die Zunahme der präzipitierten DNA des Promotors und 5'-Endes von *acaA* weist auf eine Bindung dieser genomischen DNA durch CbfA in der Entwicklungsphase hin.

Die Berechnung war ebenfalls mit den Daten der Negativkontrolle (no ChIP) durchgeführt worden. Die Werte der Zunahme bzw. Abnahme der präzipitierten DNA bewegten sich um den Wert 1 und zeigten keine Veränderung zwischen den Zeitpunkten t0 und t6. Diese Messungen legen nahe, dass die Zunahme der präzipitierten *acaA*-Promotorsequenz in der ChIP-Probe von t0 zu t6 nicht aufgrund von unterschiedlichen eingesetzten DNA-Mengen in der Chromatin-Immunopräzipitation entstanden ist, sondern durch die Protein-DNA-Interaktion von CbfA mit dem Promotor von *acaA* während der multizellulären Entwicklung von *D. discoideum*.

3.5 Konstruktion und Charakterisierung von CbfA-Deletionsmutanten

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass CbfA *in vivo* den Promotor des Genes der Adenylzyklase A bindet und vermutlich die Genexpression dieses essentiellen Entwicklungsproteins beeinflusst. Da CbfA ein Multidomänenprotein ist, sollte durch die Herstellung von CbfA-Deletionsmutanten geklärt werden, welche funktionellen Bereiche des Proteins eine Auswirkung auf die Entwicklungsinduktion ausüben.

Der Einfluss der CTD auf die Entwicklung von *D. discoideum* wurde bereits in früheren Arbeiten durch Verwendung des GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸-Proteins in der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D untersucht. Stereomikroskopische Beobachtungen des Entwicklungszyklus sowie quantitative Messungen der *acaA*- und *csaA*-Expression zeigten an, dass der C-Terminus inklusive des AT-Hakens keinen Einfluss auf Entwicklungsmarker ausübte (Lucas *et al.*, 2009). Zellen der Suppressionsmutante, die das CbfA-Derivat GFP-CbfA⁷²⁴⁻⁹⁹⁸ exprimierten, haben weiterhin den Aggregationsdefekt gezeigt. Durch diese Erkenntnis besteht die Annahme, dass andere DNA-bindende Proteindomänen von CbfA für die Vermittlung der *acaA*-Expression und der damit verbundenen Entwicklungsinduktion verantwortlich sind. Für diese Untersuchung standen besonders die Zinkfinger-Motive des CbfA-Proteins von Aminosäure 373 – 414 und 492 – 550 im Vordergrund, da diese Strukturen für die DNA-Bindung und die damit verbundenen transkriptionellen Prozesse eine wichtige Rolle spielen könnten.

Für die Deletion der Zinkfinger-Motive wurde das Plasmid pGEM-cbfA03, welches das Fusionsprotein NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ exprimiert, erneut verwendet. Durch das Einfügen mehrerer *XhoI*-Erkennungssequenzen wurden gezielt Deletionen im CbfA-Gen

Ergebnisse

durchgeführt. Die Klonierungsstrategie zur Herstellung verschiedener Deletionsmutanten ist in Abbildung 24 dargestellt.

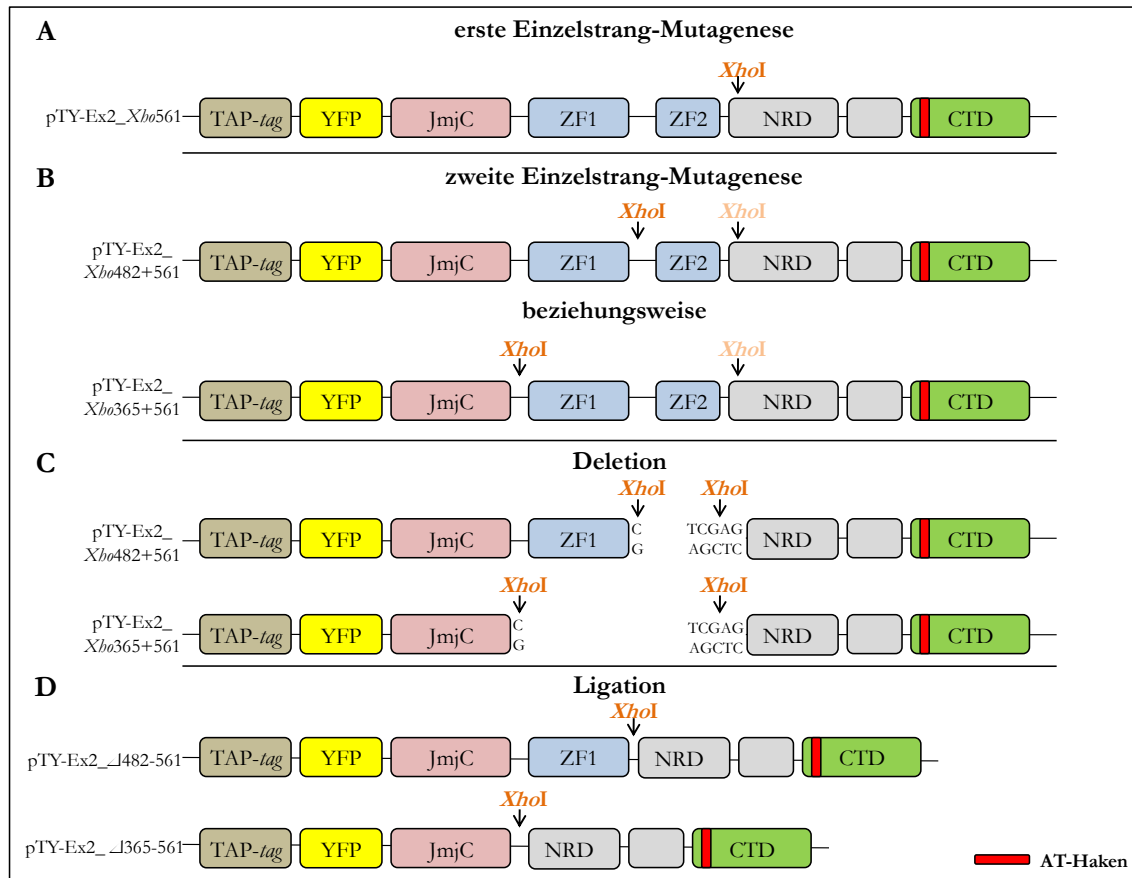


Abbildung 24: Mutagenese- und Klonierungsschema zur Herstellung von Deletionsmutanten von NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰. **A:** Einfügen der *Xho*I-Schnittstelle im Plasmid pGEM-cbfA03 an AS-Position 561+562 mit resultierenden Plasmid pTY-Ex2_Xho561; **B:** zweite Mutagenese zum Einbringen der zweiten *Xho*I-Schnittstelle an AS-Position 482+483 (pTY-Ex2_Xho482+561) bzw. an AS-Position 365+366 (pTY-Ex2_Xho365+561); **C** und **D:** Ligation der Plasmide nach Deletion der entsprechenden Sequenz mittels des Restriktionsenzymes *Xho*I.

Mittels Einzelstrang-Mutagenese wurde unter Verwendung des Primers CMBF-187 an den Triplets der Aminosäuren 561 und 562 eine *Xho*I-Schnittstelle im Plasmid eingefügt. Nach Isolierung der modifizierten Plasmid-DNA pTY-Ex2_Xho561 aus transformierten *E. coli*-Zellen und Sequenzierung der neu eingeführten Restriktionsstelle konnte eine weitere Einzelstrang-Mutagenese an diesem Plasmid stattfinden. Hier wurden für die Herstellung zweier Plasmide zum einen der Primer CMBF-188 für das Einfügen der *Xho*I-Erkennungssequenz an den Triplets der AS 482 und 483 eingesetzt und zum anderen der Primer CMBF-189 für die Mutagenese zum Erstellen einer *Xho*I-Schnittstelle an den Triplets der Aminosäuren 365 und 366 verwendet. Die resultierenden Plasmide pTY-Ex2_Xho482+561 und pTY-Ex2_Xho365+561 enthielten je zwei *Xho*I-Schnittstellen, welche für die Deletion des Bereiches als Restriktionsstellen dienten. Durch enzymatische

Ligationen der Plasmidenden wurden diese wieder zu einem funktionellen Expressionsplasmid zusammengefügt (Abbildung 24).

Die Deletionsplasmide pTY-Ex2_Δ482-561 (ΔZF2) und pTY-Ex2_Δ365-561 (ΔZF1+2) sind anschließend sequenziert und in den *D. discoideum*-Stamm JH.D(ura⁻) transformiert worden. Die unter Selektion vegetativ wachsenden Zellen wurden geerntet und die Proteinexpression anhand einer *Western-Blot*-Analyse kontrolliert (Abbildung 25). In Abbildung 25 sind außerdem weitere im Rahmen der Disseration von Annika Bilzer (Bilzer, 2010) angefertigte CbfA-Mutanten aus Zelllysaten dargestellt. Zur Detektion wurde der CbfA-spezifischen Antikörper 7F3 verwendet.

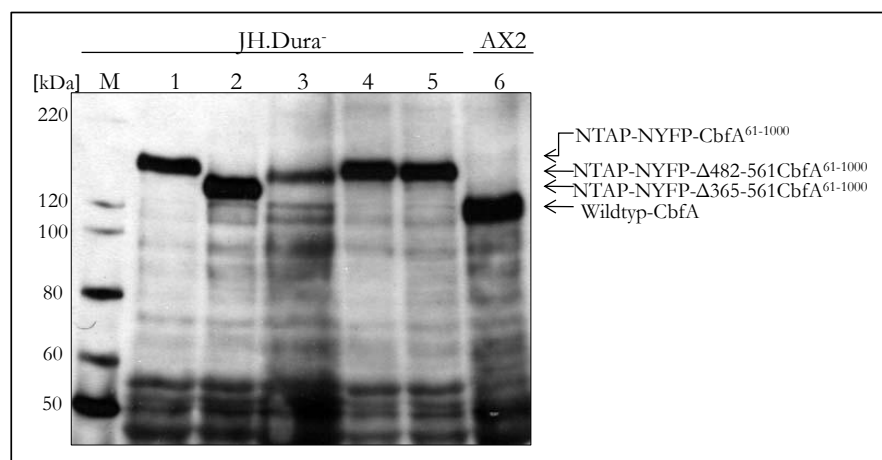


Abbildung 25: *Western-Blot* der Proteinexpression verschiedener CbfA-Derivate aus JH.D(ura⁻) bzw. AX2-Zellen. M: *magic mark* (Invitrogen), Spur 1: NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰; Spur 2: NTAP-NYFP-Δ365-561CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰; Spur 3: NTAP-NYFP-Δ482-561CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰; Spur 4: NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ (H414L) (ZF1*); Spur 5: NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ (H163A/D165A) (JmjC*); Spur 6: Wildtyp-CbfA aus AX2.

In Spur 1 der Darstellung ist die Expression der Fusion des TAP-tags, dem Gelb-fluoreszierenden Protein (YFP) und dem CbfA-Derivat von Aminosäuren 61-1000 abgebildet. Dieses Fusionsprotein besaß eine Molekülmasse von 158 kDa. Durch die Deletion beider Zinkfinger-Motive im CbfA-Derivat wies das Protein der Spur 2 eine geringere Molekülmasse von 136 kDa auf. Die Masse des Proteins mit der Deletion nur des zweiten Zinkfinger-Motives in Spur 3 betrug 149 kDa.

In Spur 4 und 5 sind jeweils NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ Proteine dargestellt, denen durch Punktmutationen spezifische Proteindomänen funktionell ausgeschaltet wurden. Durch eine Mutation im Gen des CbfA-Derivats wurde ein Austausch von Histidin zu Leucin an der Aminosäureposition 414 erzeugt. Dieses Histidin ist spezifisch für den ersten Zinkfinger von CbfA (Winckler, persönliche Mitteilung). Vermutlich wurde somit der erste Zinkfinger von CbfA nicht mehr vollständig ausgebildet, wodurch keine funktionelle Bindung mehr vermittelt werden konnte.

Ergebnisse

Das Protein in Spur 5 besaß durch zwei Mutationen im CbfA-Gen einen Austausch der Aminosäuren an Position 163 (H163A) und 165 (D165A). Dadurch wurde das katalytische Zentrum der JmjC-Domäne CbfAs inaktiviert (Hogan *et al.*, 2000; Clifton *et al.*, 2006).

In Spur 6 wurde als Kontrolle für die Antikörperreaktion und als Größenvergleich das Wildtyp-Protein von CbfA, das eine Masse von 114 kDa besitzt, aufgetragen.

Wie in Abbildung 25 zu erkennen ist, wurden bis auf das CbfA-Derivat mit der Deletion des zweiten Zinkfingers alle Proteine in ihrer Intensität ähnlich zum Wildtypprotein exprimiert. Speziell der Verlust des zweiten Zinkfingermotives schien zu einer geringen Expression des Proteins der Spur 3 zu führen. Es konnte aber davon ausgegangen werden, dass die vorhandene Proteinkonzentration von NTAP-NYFP-Δ482-561CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ für eine Entwicklungsanalyse in den Zellen ausreichend war. In der Arbeit von Winckler *et al.* (2001) zeigte die *cbfA*-Suppressionsmutante JH.A, die das Volllängenprotein noch bis zu 20 % des Wildtyp-Levels bildete, einen moderaten Entwicklungsphänotyp, der mehr Ähnlichkeiten mit AX2 als mit JH.D erkennen ließ.

Für die Darstellung der multizellulären Entwicklung wurde eine definierte Zahl transformierter Zellen auf einen Phosphatagar ausplattiert. Durch die nährstofffreie Umgebung stellten die Zellen das Wachstum ein und induzierten die Entwicklung. Nach 18, 22, 26, 30 und 44 Stunden wurde das jeweilige Entwicklungsstadium stereomikroskopisch fotografiert. In Abbildung 26 sind die Resultate dargestellt. Im oberen Bereich der Abbildung wurde im Sppressionsstamm JH.D(*ura*) die multizelluläre Entwicklung der Zellen aufgrund der Expression des Fusionsproteins NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ eingeleitet. Nach 30 Stunden waren voll ausgebildete Fruchtkörper vorhanden. Da die Deletionen und Aminosäureaustausche an diesem Fusionsprotein stattgefunden haben, wurden diese Zellen als Entwicklungsvergleich verwendet. In der zweiten Reihe der Darstellung ist der Einfluss beider Zinkfingerdeletionen abgebildet. Es ist zu erkennen, dass beim Verlust beider Zinkfinger die Entwicklung um mehr als 10 Stunden verlangsamt erfolgte und die ausgebildeten *Mounds* und *Slugs* vergrößert waren. Die in ihrer Anzahl verringerten Fruchtkörper zeigten einen kürzeren Stiel bzw. waren nach 44-stündiger Entwicklung nicht vollends ausgebildet.

In den folgenden beiden Abbildungsreihen ist je ein Zinkfinger funktionell inaktiviert worden, entweder durch einen definierten Aminosäureaustausch oder durch Deletion des relevanten Proteinbereiches. Die Inaktivierung des ersten Zinkfingers zeigte ebenfalls negative Auswirkungen auf das multizelluläre Stadium von *D. discoideum* (Abbildung 26, Reihe 3). Das *Mound*-Stadium der Entwicklung wurde nicht überschritten. Obgleich der

zweite Zinkfinger vorhanden war, bildeten sich keine Fruchtkörper aus. Außerdem waren die *Mounds* in ihrer Ausprägung deutlich vergrößert.

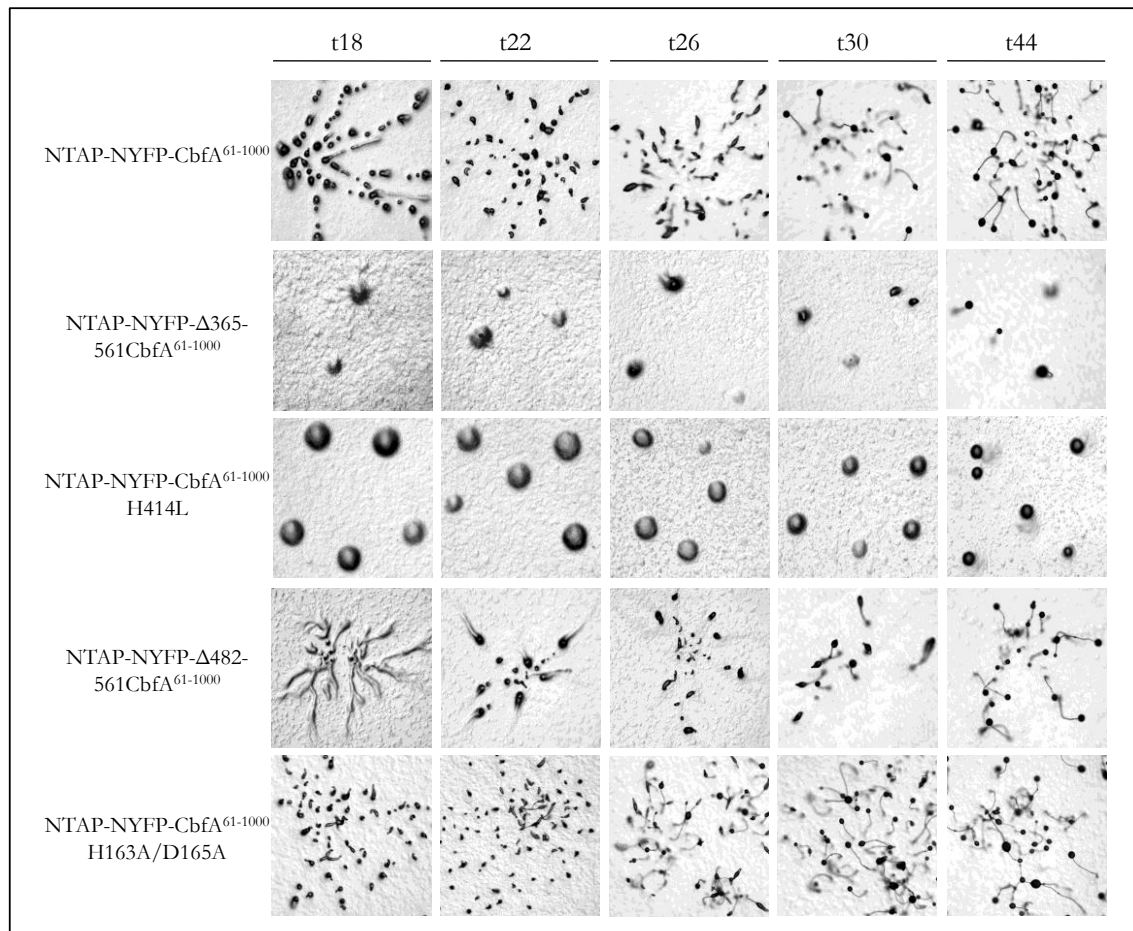


Abbildung 26: Multizelluläre Entwicklung von NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ und verschiedener CbfA-Mutanten in JH.D(ura-) auf Agar-Phosphatplatten. t18-t44: geeignete Zeitpunkte der Entwicklung; alle Aufnahmen bei 57x Vergrößerung.

Das Fehlen des zweiten Zinkfingers schien weniger für den Entwicklungsprozess bedeutsam. Nach 30 Stunden waren erste Fruchtkörper ausgebildet. Die Entwicklung war zwar um wenige Stunden retardiert, jedoch unterschieden sich die Fruchtkörper nach 44 Stunden nicht in ihrer Morphologie von denen des Vergleichsstammes. Es ist jedoch zu beachten, dass nur zwei Klone dieser Deletion in ihrer Entwicklung im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden konnten. Der zweite Klon wies keine Entwicklungsstadien auf (Abbildung nicht gezeigt). Hier wurde aufgrund des sehr instabilen Proteins davon ausgegangen, dass das CbfA-Derivat soweit abgebaut wurde, dass keine Entwicklung mehr eingeleitet werden konnte. Zur Bestätigung des gezeigten Ergebnisses in Abbildung 26 müssen weitere Transformanten in Bezug auf die Deletion des zweiten Zinkfingers in ihrer multizellulären Entwicklung analysiert werden.

Dennoch kann festgestellt werden, dass die vermeintlich unterstützende DNA-Bindung durch den ersten der beiden Zinkfinger ausreichte, um im Vergleich zu dem vollständig

funktionellen Fusionsprotein die Entwicklung in ähnlichen Umfang einzuleiten. Obwohl die Anzahl der Fruchtkörper geringer ausfiel, konnte eine vollständige multizelluläre Entwicklung beobachtet werden. Nur der funktionelle Verlust beider bzw. nur des ersten Zinkfinger-Motives führten zu einer unvollständigen Entwicklungsphase von *D. discoideum*. In der letzten Reihe der Darstellung wird der Defekt des katalytischen Zentrums der JmjC von CbfA auf die multizelluläre Entwicklung abgebildet. Zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung waren ähnliche Zellstadien wie in dem Vergleichsstamm zu beobachten. Die Ausprägungen der *Mounds* und *Slugs*, sowie nach 30-stündiger Entwicklung der Fruchtkörper, schienen in ihrer Morphologie und Anzahl annähernd gleich zum Vergleichsstamm zu sein. Die JmjC-Mutante zeigte keinen Entwicklungsphänotyp in der Gegenüberstellung zum Stamm JH.D(ura), der die CbfA-Komplementation NTAP-NYFP-CbfA⁶¹⁻¹⁰⁰⁰ exprimierte. Demzufolge war die Funktion der JmjC-Domäne nicht für die Induktion der multizellulären Entwicklung essentiell.

3.6 Die JumonjiC-Domäne von CbfA: eine funktionelle Beschreibung

3.6.1 Untersuchungen des Methylierungsstatus am Lysin 4 und 9 des Histons H3 mittels Immunofluoreszenz

Durch post-translationale Modifikationen, wie beispielsweise die Demethylierung von Histonlysinnenresten, werden die Chromatinstruktur und die Genexpression reguliert. In einer Reihe von Veröffentlichungen konnten für Proteine, die eine JumonjiC-Domäne besitzen, Demethylaseaktivitäten an verschiedenen Lysinmethylierungen des Histon H3 festgestellt werden (Shi *et al.*, 2004; Klose *et al.*, 2006a; Yamane *et al.*, 2006; Xiang *et al.*, 2007; Christensen *et al.*, 2007 u.a.).

Um erste Erkenntnisse zur Funktion der JmjC-Domäne von CbfA zu erhalten, sind Immunofluoreszenzfärbungen spezifischer Histonmethylierungen in den *D. discoideum*-Stämmen AX2 und JH.D in der Abteilung für Genetik von Prof. Dr. Wolfgang Nellen der Universität Kassel durchgeführt worden. Im Fokus der Analysen standen die Methylierungen von Histon H3 des Lysins an Position 4 (H3K4me) und 9 (H3K9me). Für die Markierungen wurden eine spezifische Anzahl vegetativ wachsender Zellen fixiert und mittels den Antikörpern α -H3K4 bzw. α -H3K9 für di- und trimethyliertes Lysin rot fluoreszenzmarkiert. Das gesamte Chromatin des Zellkerns konnte mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI blau dargestellt werden. Die Resultate der Färbungen sind in Abbildung 27 zu sehen. In den oberen beiden Reihen dieser Darstellung ist für beide Stämme zu erkennen, dass eine Markierung von di- und trimethylierten Lysin 4 des Histons H3 am gesamten Chromatin stattfindet. Da diese Methylierungen für aktive Genbereiche

des Euchromatins kennzeichnend sind, ist dieses Ergebnis zu erwarten gewesen (Santos-Rosa *et al.*, 2002; Martin & Zhang, 2005). In der Gegenüberstellung von AX2 und JH.D ist kein Unterschied in der Intensität der markierten Histone für di- bzw. trimethylierte Lysinreste an Position 4 zu erkennen. Der fast vollständige funktionelle Verlust von Cbfa in JH.D führte zu keiner detektierbaren Veränderung der Methylierungsmuster im Vergleich zu AX2.

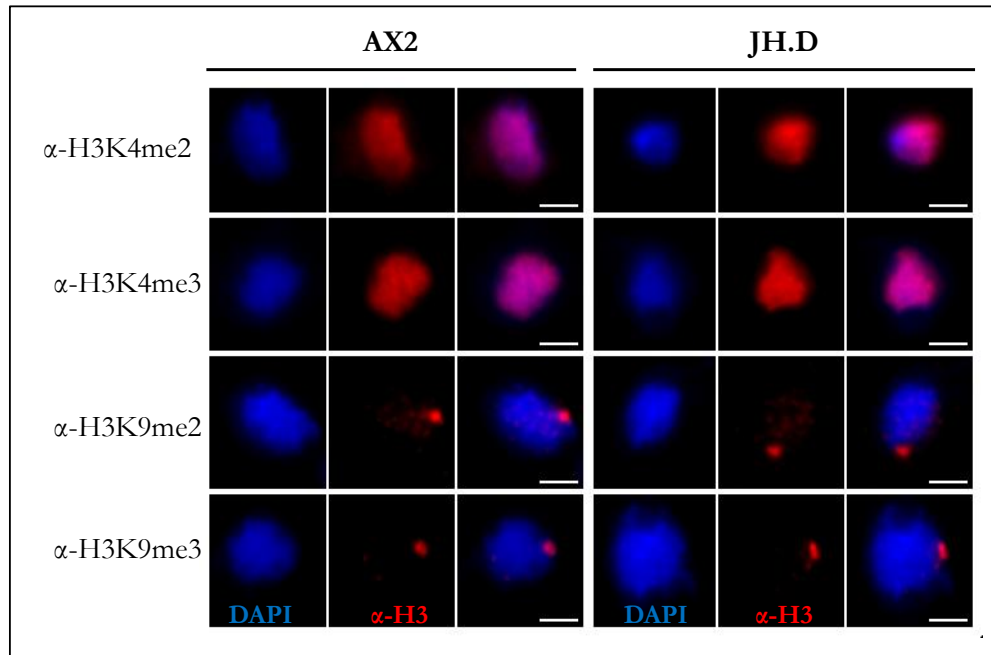


Abbildung 27: Immunofluoreszenzfärbung von di- und trimethylierten Lysinen an Position 4 bzw. 9 von Histon H3. Vegetativ wachsende Zellen von AX2 und JH.D wurden fixiert und die Histone durch Verwendung von α -H3K4me2/me3 bzw. α -H3K9me2/me3 markiert. Spalte 1: DAPI-Färbung des Zellkern (blau); Spalte 2: Methylierungsspezifische Färbung (rot); Spalte 3: merge; Größenstandard: 2 μ m.

In den unteren zwei Reihen der Abbildung 27 wurden die Lysinmethylierungen an Position 9 des Histons H3 fluoreszenzmarkiert. Im Gegensatz zu den oberen Zellkernen konnte hier nur eine punktförmige Markierung am Zellkernrand erkannt werden. Die Methylierung des Lysin 9 von Histon H3 ist besonders im heterochromatischen Chromatin-Bereich zu finden (Martin & Zhang, 2005; Kaller *et al.*, 2007). In *Dictyostelium discoideum* sind diese DNA-Bereiche vorwiegend DIRS-1 angereicherte Sequenzcluster, die vermutlich als Centromere dienen und somit als Spot im Chromatingeflecht auftauchen (Eichinger *et al.*, 2005). Vergleicht man auch hier die Farbintensität der Histon-Methylierungen zwischen AX2 und JH.D ist ebenfalls kein Unterschied zu erkennen. Würde Cbfa als einzige Demethylase des Lysins an Position 9 von Histon H3 wirken, wäre in der *cbfA*-Mutante durch den funktionellen Verlust von Cbfa ein verstärktes Farbsignal zu erwarten gewesen und vermutlich eine Ausbreitung der Heterochromatisierung in euchromatische Bereiche aufgetreten. Es scheint, dass durch diese experimentelle Darstellung Cbfa keine Funktion

als Demethylase weder für di- noch für trimethyliertes Lysin 4 bzw. 9 von Histon H3 ausübte.

3.6.2 CbfA erkennt die Trimethylierung von Lysin 9 im Histon H3

Die Vermutung, dass CbfA durch die JmjC-Domäne eine Demethylasefunktion an Histon H3 ausübt, wurde anhand eines *Peptid-Pull-down-Assays* weiter verfolgt. Um modifizierte Histon-Lysinreste zu demethylieren, müssen diese zuerst erkannt werden. Effektorproteine erfassen spezifische Modifikationen von Histonen über funktionelle Proteindomänen, zu denen auch das PHD-Finger-Motiv gezählt wird (Wysocka, 2006). Da CbfA einen PHD-ähnlichen Zinkfinger besitzt, liegt die Vermutung nahe, dass über dieses Motiv CbfA Histon-Markierungen erkennt und die JmjC-Domäne dadurch eine enzymatische Funktion an Histon-Methylierungen ausüben kann.

Für weitere Untersuchungen zur Klärung der JmjC-Funktion wurden Zellkernextrakte von AX2-Zellen verwendet. Die für den *Assay* notwendigen Peptide von Histon H3 wiesen eine Länge von 27 Aminosäuren auf und waren am C-Terminus mit Biotin markiert. Die Histon H3-Moleküle unterschieden sich nur anhand ihrer Methylierung. Während ein Peptid als Kontrolle nicht methyliert war, waren zwei weitere je am Lysin 4 bzw. am Lysin 9 dreifach methyliert. Für die Durchführung des *Assays* konnte sich an der Arbeit von Wysocka (2006) orientiert werden. Nach Inkubation der Peptide mit Kernextrakt von AX2 und anschließender Isolierung durch magnetische Streptavidin-*Beads* wurde das durch die Peptide präzipitierte CbfA-Protein mittels der SDS-PAGE dargestellt. Erkannte CbfA eine der Histonmodifikationen spezifisch, sollte das Protein im *Western-Blot* durch den CbfA-Antikörper 7F3 mit einer Masse von ca. 114 kDa detektierbar sein.

In der Abbildung 28 sind verschiedene *Western-Blot*-Analysen von *Peptid-Pull-down*-Experimenten mit AX2-Kernextrakten dargestellt. Die nach dem Marker folgende Bande eines *Western-Blots* zeigt einen spezifischen Prozentsatz des eingesetzten Kernextraktes. Gefolgt wird diese von der Leerkontrolle, in der kein Peptid in dem *Pull-down-Assay* verwendet worden war. Die drei weiteren Banden zeigen das aufgrund spezifischer Histonpeptide präzipitierte CbfA-Protein, wobei ein unmodifiziertes Peptid als weitere Negativkontrolle und H3K4me3- bzw. H3K9me3-Peptide als Modifizierungen von Histon H3 dienten.

Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, wurde CbfA durch das dreifach methylierte Lysin 9 von Histon H3 gebunden. Dies konnte auch durch Verwendung hoher Salzkonzentrationen von 300 mM und 400 mM des Waschpuffers, wodurch eventuelle, unspezifische Peptid-Proteininteraktionen gelöst wurden, wiederholt werden.

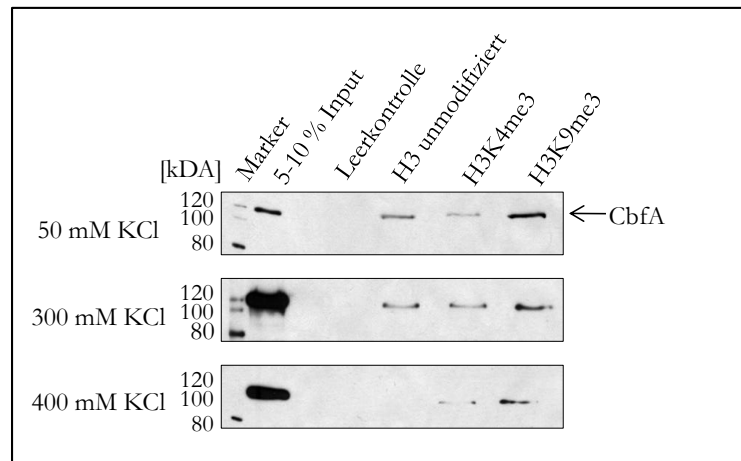


Abbildung 28: Western-Blot-Analysen der Peptid-Pull-down-Assays unter Verwendung von AX2-Kernextrakt. *Pull-down-Assay* mit Erkennung der H3K9me3-Methylierung durch CbfA bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen des Waschpuffers; Antikörper 7F3 im *Western-Blot* gegen CbfA.

3.6.3 Chromatin-Immunopräzipitationen anhand spezifischer Histonmethylierungen

Die im Kapitel 3.3 von CbfA regulierten Gene spezifischer Cluster konnten auch für weitere Analysen zur JmjC-Funktion verwendet werden. Es bestand die Annahme, dass eine CbfA-abhängige Regulation dieser Gene über den Methylierungsstatus verschiedener Lysinreste des Histons H3 erfolgen könnte. Welche Modifizierung das Histon H3 der stellvertretenden Gene jedes Clusters besitzt und ob CbfA als vermutliche Demethylase diese Methylierung verändert, sollte durch die vergleichende Darstellung der Chromatin-Immunopräzipitationen der Stämme AX2 und JH.D untersucht werden (Abbildung 29). Entfernt CbfA sukzessiv Methylgruppen an Lysinresten des Histons H3, könnte diese Funktion in der *cbfA*-Suppressionsmutante erkannt werden. Insbesondere für Gene der Cluster I, II, IV und VI war diese Untersuchung interessant, da diese Gene durch Gesamt-CbfA reguliert wurden und die C-terminale Domäne von CbfA allein die Regulation nicht ausführen konnte (Lucas *et al.*; 2009). Es besteht daher der Verdacht, dass über eine JmjC-Domäne vermittelte Eisen(II)-abhängige Dioxygenase-Funktion von H3K9me3 eine Aktivierung der Gene aus den Clustern I und II erfolgen könnte. Ein *Silencing* der Gene aus den Clustern IV und VI wäre durch die Demethylierung von H3K4me3 möglich.

Für die Histon-ChIP-Analysen wurden drei Antikörper eingesetzt, die jeweils die Histonmodifikationen H3K4me2, H3K4me3 und H3K9me3 erkannten. Als Positivkontrolle der ChIP-Methode wurde die Methylierung des LTR-Retrotransposons DIRS-1 zusätzlich dargestellt. DIRS-1 trägt je nachdem, ob es im Euchromatin oder im Heterochromatin integriert ist, eine H3K4- oder eine H3K9-Trimethylierung. Da für alle Chromatin-Immunopräzipitationen dasselbe Zellmaterial verwendet wurde, konnte davon

Ergebnisse

ausgegangen werden, dass die mittels α -H3K4me2 durchgeführte ChIP ebenfalls erfolgreich verlaufen würde. Ein Kontrollgen mit dieser Maskierung ist in der Darstellung nicht verwendet worden. In Abbildung 29 sind für AX2 bzw. JH.D folgenden PCR-Produkte von links nach rechts dargestellt.

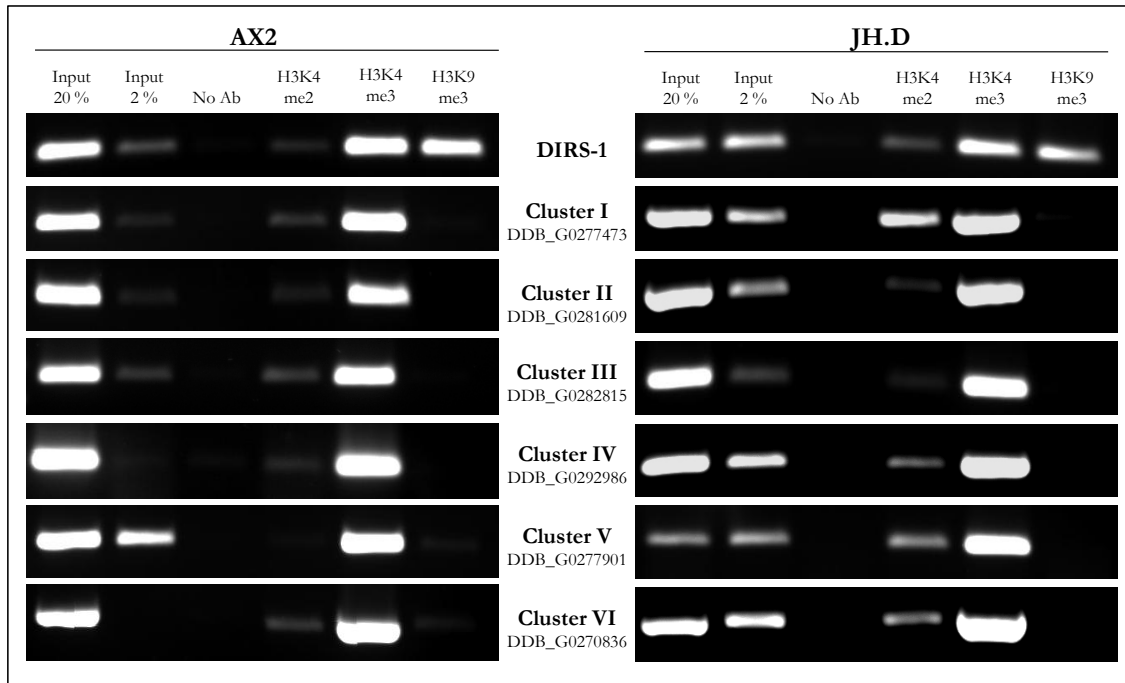


Abbildung 29: Histon-ChIP-Analysen für unterschiedlich methyliertes Histone H3 vergleichend zwischen AX2 und JH.D. Dargestellt werden verschiedene Inputkonzentrationen, die Negativkontrolle (*no Ab*) und die unter Verwendung verschiedener Antikörper präzipitierten Chromatin-DNA; amplifiziert sind der ORF2-Sequenzbereich von DIRS-1 und promotornahe Bereiche repräsentativer Clustergene.

Zum Größen- und Intensitätsvergleich der Banden ist eine PCR an zwei Input-Proben unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt worden. Außer für DIRS-1 und dem Gen von Cluster V in JH.D, in denen die Amplifikation in der 20%igen Inputprobe nicht optimal erfolgte, sind die prozentualen Unterschiede anhand der Bandenstärke zu erkennen. Die folgende „no AB“-Kontrolle war eine ohne Antikörper durchgeführte ChIP als Negativkontrolle. In den drei rechten Spalten der Abbildung von AX2 bzw. JH.D wurden die durch drei unterschiedliche Histonmodifikationen präzipitierten Gensequenzen dargestellt. In der ersten Reihe sind die Amplifikationen von verschiedenen Histon-ChIP-Analysen des DIRS-1-Elementes abgebildet. Dieses Transposon besitzt eine H3-Maskierung von Lysin 4, wenn es im euchromatischen und von Lysin 9, wenn es im heterochromatischen Genom-Bereich integriert ist (Kaller *et al.*, 2007; Santos-Rosa *et al.*, 2002).

Alle untersuchten Clustergene im Stamm AX2 konnten nur in der ChIP-Analyse amplifiziert werden, in der die Histon-Seitenketten von H3 eine H3K4-Trimethylierung

trugen. Eine Amplifikation der Gene in der mittels den Antikörpern α -H3K4me2 und α -H3K9me3 durchgeführten Histon-ChIP ist sehr schwach zu erkennen.

Im Stamm JH.D scheinen die Histon-Seitenketten von H3 der analysierten Gene eine H3K4me3-Methylierung ähnlich wie in Stamm AX2 zu besitzen. Die leicht verstärkten Banden der amplifizierten Sequenzen aus der mittels α -H3K4me2 hergestellten Histon-ChIP verweisen vermutlich auf keine signifikante Veränderung durch den Verlust von CbfA, da auch die 2%ige Inputbande im Vergleich zu AX2 ebenso verstärkt amplifiziert wurde.

Da die Modifikationen der H3-Histone der untersuchten Gene im Stamm JH.D im Vergleich zu AX2 keine Unterschiede zeigten, schien die CbfA-vermittelte Genregulation nicht anhand von Demethylierungen der Histon-Seitenketten zu erfolgen.

3.6.4 Heterologe Expression der JmjC-Domäne in bakteriellen Expressionssystemen

Um weitere Analysen zur Funktion der JmjC-Domäne von CbfA durchführen zu können, sollte diese als rekombinantes Protein für verschiedene *Assays* zur Verfügung gestellt werden. Die heterologe Expression von Proteinen oder Proteindomänen ist meist eine Voraussetzung für deren strukturelle und biochemische Charakterisierung. Bakterielle Expressionssysteme besitzen den Vorteil, dass sie einfach zu handhaben sind und meist hohe Expressionsraten vorweisen. Der Nachteil besteht darin, dass die hohe Expressionsrate von eukaryotischen Proteinen oft zu hydrophoben Faltungsintermediaten (*inclusion bodies*) führen kann, wodurch die funktionelle Aktivität des Proteins verloren geht. Die Wahl des Wirtsstammes, der Vektoren und Kulturbedingungen sind ausschlaggebend für den Erfolg der Proteinexpression (Cabrita & Bottomley, 2004). Schon durch die Verwendung von Fusionsproteinen und Variationen in den Wachstumsbedingungen können die Löslichkeit und Stabilität des Zielproteins verbessert werden (Terpe, 2003).

Für die Expression der JumonjiC-Domäne von CbfA sind zwei verschiedene bakterielle Expressionssysteme eingesetzt worden. Das pMAL-Expressionssystem bietet den Vorteil, eine Fusion des Maltose-Bindeproteins (MBP) mit dem Zielprotein zu exprimieren, während durch den pET-Expressionsvektor das Zielprotein mit einem N-terminal gelegenen Histidinhexamer versehen wird. Für die Expression der Proteindomäne wurde die codierende Sequenz des *cbfA*-Gens aus AX2 von Aminosäure 2 bis 370 durch Verwendung der Primer CMBF-131/132 amplifiziert und in die entsprechenden Vektoren kloniert. Obwohl die JumonjiC-Domäne in CbfA sich von Aminosäure 113 bis 280 erstreckt, wurde ein größerer Bereich des CbfA-Proteins für die Expression verwendet. Dieser beinhaltet beinahe den gesamten N-Terminus von CbfA. Durch die Klonierung in den pMAL-Expressionsvektor bestand die Möglichkeit, die Fusion der JmjC-Domäne mit dem Maltose-Bindeprotein an immobilisierter Maltose zu isolieren und über eine Erhöhung der Maltosekonzentration zu eluieren. Das mit einem 6 x Histidin-*tag* versehene JumonjiC-Protein konnte über die Affinität zu Nickel mittels einer Metallchelate-Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Bevor das jeweilige Protein aufgereinigt wurde, war eine Untersuchung der Löslichkeit des exprimierten Proteins notwendig. Dafür wurde eine Gegenüberstellung der in BL21(DE3)-Zellen hergestellten löslichen Proteinfraction und des Zellysatpellels durchgeführt. In Abbildung 30 wird ein Vergleich durch eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung dargestellt. In beiden Expressionssystemen ist die jeweilige Proteinexpression durch Zugabe von IPTG für zwei Stunden induziert worden. Vergleicht man die

Proteinmenge des Zelllysates mit der Menge in der löslichen bzw. unlöslichen Fraktion, ist zu erkennen, dass sich fast der gesamte Anteil der rekombinanten Fusionsproteine in beiden Systemen im Lysatpellet befand. Das mit einem His₆-tag versehene CbfA-Derivat mit einer Masse von 48,2 kDa sowie das Fusionsprotein mit dem Maltose-Bindeprotein, das eine Masse von 85,6 kDa aufwies, wurden exprimiert und lagen als unlösliche Faltungsintermediate in den Zellen vor. Bei einem Vergleich der Expressionsrate beider Systeme ist zu erkennen, dass die Bildung des Fusionsproteins im pMAL-System effektiver ist als im pET-System, da beide Induktionen, standardisiert auf die optische Dichte bei 600 nm, bei gleicher Temperatur und Induktionsdauer stattgefunden haben.

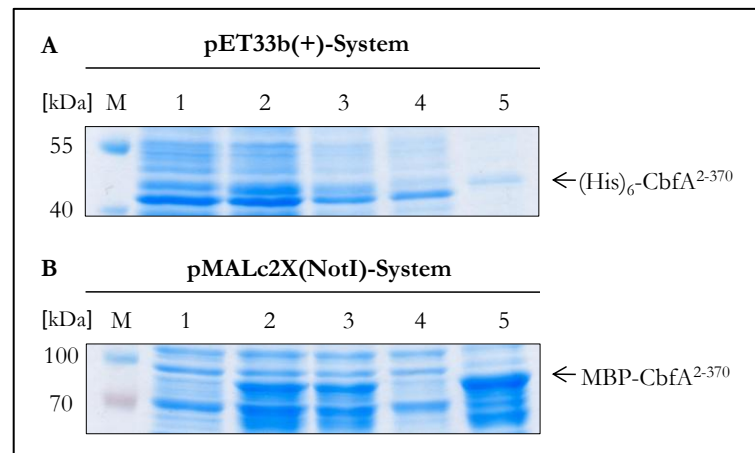


Abbildung 30: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA²⁻³⁷⁰. Expression im pET-System (A) und pMAL-System (B) in BL21(DE3)-Zellen von *E. coli* bei 37°C; M: *prestained protein marker* (Fermentas); Spur 1: nicht induzierte Zellen, Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Zelllysate; Spur 4: lösliche Fraktion; Spur 5: unlösliche Fraktion.

Die Isolierung des Zielproteins aus der löslichen Fraktion besitzt den Vorteil, dass das Protein in nativer Form vorliegt und sofort für Aktivitätsassays eingesetzt werden kann. Bei der Aufreinigung von *inclusion bodies* müssen diese solubilisiert und das Zielprotein rückgefaltet werden. Durch einen Wechsel des Expressionsstammes oder veränderte Kulturbedingungen wurde versucht, die Expression des funktionell aktiven, löslichen Proteins zu erhöhen. Die dafür verwendeten *E. coli*-Stämme (BL21-CodonPlus und RosettaTM) besaßen ein zusätzliches Plasmid, das weitere Kopien von selten in Bakterien verwendeten tRNA-Genen zur Verfügung stellte und die *Codon-Usage* dadurch verbessern sollte (Cabrita & Bottomley, 2004). Die rekombinante Proteinexpression in diesen *E. coli*-Stämmen konnte für andere Proteine von *D. discoideum* bereits verwendet werden (Ubeidat & Rutherford, 2002). Ein Vergleich der Proteinexpressionen des CbfA-Derivates ist in Abbildung 31 dargestellt.

Die BL21-CodonPlus-Zellen führten im Vergleich zu den BL21-Zellen zu einer erhöhten Proteinexpression vermutlich durch die Bereitstellung der zusätzlichen tRNA-Gene für

Ergebnisse

weitere Codons von Arginin, Isoleucin und Leucin (RIL) in beiden Systemen. Ähnliches war in dem RosettaTM-Stamm zu beobachten, der neben den bereits genannten, ferner tRNA-Gene für Prolin und Glycin zur Verfügung stellte. Die Expression des Fusionsproteins von dem Maltose-Bindeprotein mit CbfA²⁻³⁷⁰ war deutlich verstärkt. Dennoch ist zu erkennen, dass in beiden Systemen unabhängig des Expressionsstammes die Menge an löslichem Protein vergleichsweise zur Expression in BL21-Zellen nicht zugenommen hatte (Spur 4). Die optimierte Expression führte nur zu einer erhöhten Menge an unlöslichem, funktionell inaktivem Protein (Spur 5).

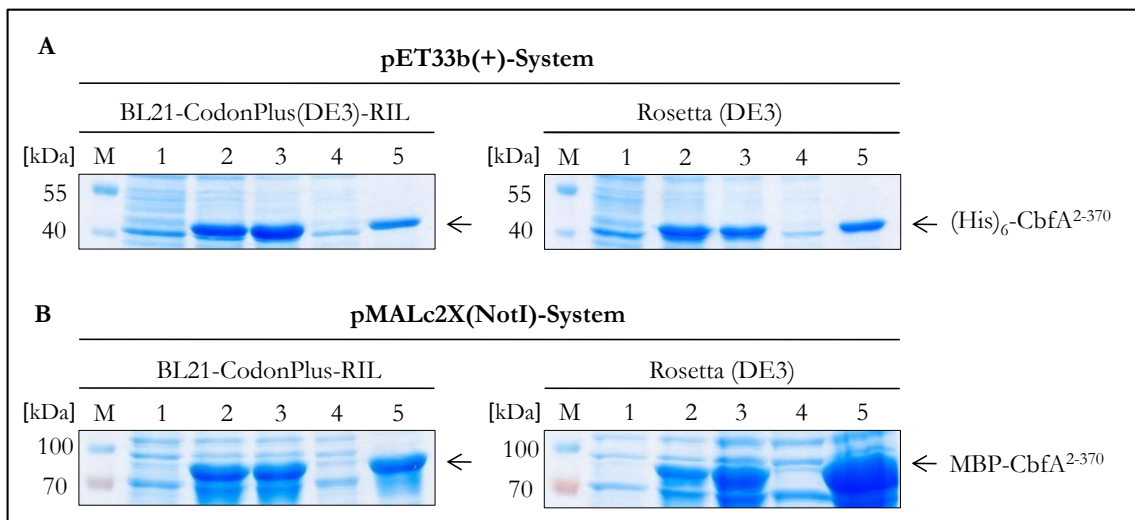


Abbildung 31: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA²⁻³⁷⁰ in verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Expression im pET-System (A) und pMAL-System (B) bei 37°C; M: *prestained protein marker* (Fermentas); Spur 1: nicht induzierte Zellen, Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Zellysate; Spur 4: lösliche Fraktion; Spur 5: unlösliche Fraktion.

Durch eine verkürzte Wachstumszeit nach der Induktion ist eine bestimmte, meist nur geringe Menge an rekombinant exprimierten Protein vorhanden. Durch die verminderte Menge besteht die Möglichkeit, dass keine Aggregate des Zielproteins entstehen und dieses in aktiver Form in den Zellen vorliegt. Durch den Versuch, das CbfA-Derivat durch eine zeitlich verkürzte Wachstumszeit herzustellen, wurde die Annahme geklärt, ob das Zielprotein zwar in geringem Maße aber in löslicher Form zu exprimieren ist.

In Abbildung 32 wird ein Vergleich von drei unterschiedlichen Wachstumszeiten abgebildet. Es ist sehr gut zu erkennen, dass eine längere Wachstumszeit mit zunehmender Proteinexpression korrelierte. Weiterhin ist ersichtlich, dass die Variationen der Wachstumsdauer keinen Einfluss auf die lösliche Proteinfraction ausübten. In allen Versuchen, unabhängig des Expressionssystemes oder des *E. coli*-Stammes, befand sich über 90 % des Zielproteins in der unlöslichen Proteinfraction.

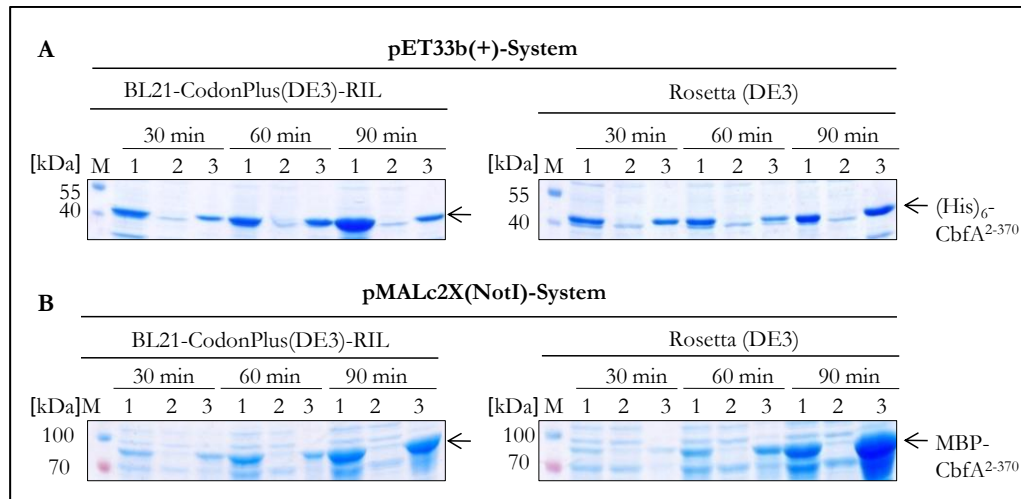


Abbildung 32: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA²⁻³⁷⁰ in verschiedenen *E. coli*-Stämmen und bei unterschiedlichen Wachstumszeiten. Expression im pET-System (A) und pMAL-System (B) für 30, 60 und 90 Minuten bei 37°C; M: *prestained protein marker* (Fermentas); Spur 1: Zellysat, Spur 2: löslichen Fraktion; Spur 3: unlösliche Fraktion.

Da die Veränderung der Wachstumszeit keine Verbesserung hinsichtlich der löslichen Proteinmenge der CbfA-Derivate ergeben hatte, bestand eine weitere Aussicht die Proteinexpression zu beeinflussen darin, die Kulturbedingungen zu verändern. Indem die Bakterienkultivierung unter 37°C stattfinden sollte, wird auf der einen Seite die Teilungsgeschwindigkeit und der gesamte Proteinstoffwechsel der Zellen vermindert, auf der anderen Seite erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit, dass das langsam exprimierte Protein in löslicher Form bestehen bleibt. Um das zu testen, wurden der BL21-CodonPlus-Stamm und der RosettaTM-Stamm bei 20°C und 30°C kultiviert und die Proteinbanden vergleichend zur Expression bei 37°C in Abbildung 33 als Coomassie gefärbtes Polyacrylamid-Gel dargestellt.

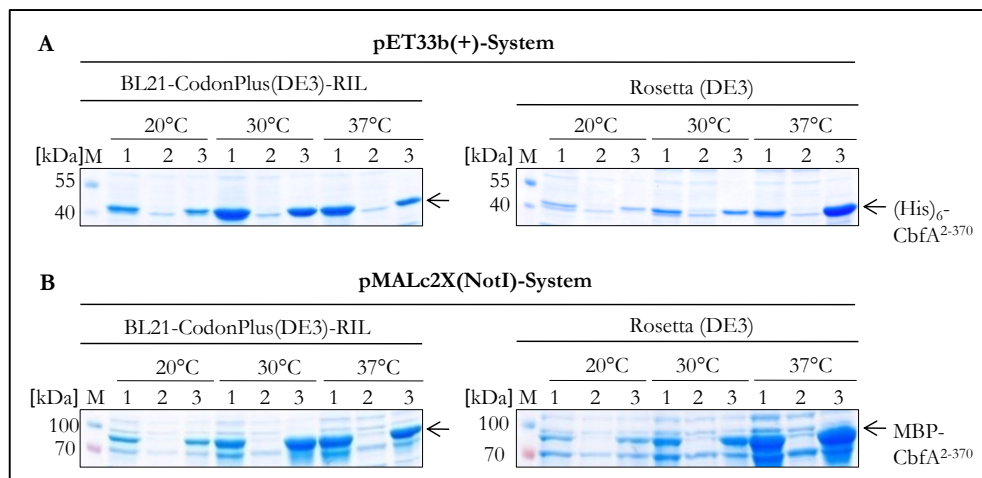


Abbildung 33: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA²⁻³⁷⁰ in verschiedenen *E. coli*-Stämmen und bei unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen. Expression im pET-System (A) und pMAL-System (B) für zwei Stunden bei 20°C, 30°C und 37°C Induktions-temperatur; M: *prestained protein marker* (Fermentas); Spur 1: Zellysat, Spur 2: löslichen Fraktion; Spur 3: unlösliche Fraktion.

Ergebnisse

Eine veränderte Expression in Bezug auf die lösliche Proteinmenge in Abhängigkeit zur Induktionstemperatur war weder in den unterschiedlichen Expressionssystemen noch in den *E. coli*-Stämmen aufgetreten. In allen Versuchen waren über 90 % der rekombinanten Proteinmenge in der unlöslichen Fraktion zu finden.

Eine weitere Möglichkeit, die rekombinante Proteinexpression zu beeinflussen, bestand in der Verwendung eines dritten bakteriellen Expressionsstammes, dem ArcticExpress™. Die Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie bei einer Temperatur von 12°C wachsen und zusätzlich ein Plasmid besitzen, wodurch die Chaperonproteine Cpn60 und Cpn10 mit einer Masse von 60 kDa bzw. 10 kDa codiert werden. Diese Faltungshelfer können die Proteinbildung unterstützen und eine Aggregation von Proteinen verhindern. Die Ergebnisse der Induktionsversuche sind in Abbildung 34 dargestellt.

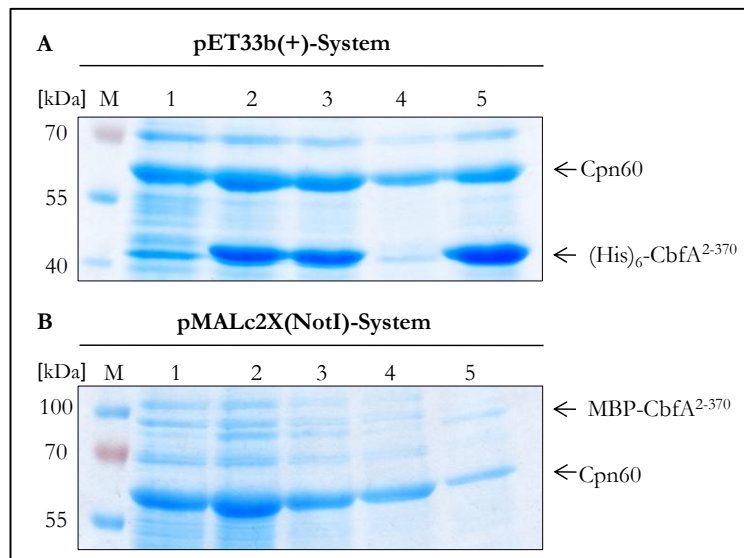


Abbildung 34: Induktionsvergleiche der Fusionsproteine mit CbfA²⁻³⁷⁰ bei einer Kultivierung von 12°C. Expression im pET-System (A) und pMAL-System (B) in ArcticExpress™-RIL-Zellen von *E. coli*; M: *prestained protein marker* (Fermentas); Spur 1: nicht induzierte Zellen, Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Zelllysat; Spur 4: lösliche Fraktion; Spur 5: unlösliche Fraktion.

Obwohl in den Zellen des ArcticExpress™-Stammes die Herstellung des Zielproteins bei 12°C über 24 Stunden erfolgte und die Chaperonproteine als Faltungshelfer dienten, konnte keine ausreichende Menge an löslichen Protein weder im pET-System noch im pMAL-System gewonnen werden. Bei einer Verwendung dieser Zellen befanden sich ebenfalls über 90 % des rekombinanten Proteinanteils in dem Lysatpellet (Abbildung 34; Spur 5). Während die Expression des mit einem Histidin-Tag markierten Fusionsproteins im Vergleich zu anderen *E. coli*-Stämmen annähernd gleich geblieben war, hatte sich die Expression der Fusion von CbfA²⁻³⁷⁰ mit dem MBP stark verringert.

Alle Versuche, die Fusionsproteine mit dem Zielprotein CbfA²⁻³⁷⁰ in löslicher Form zu erhalten, sei es durch Verwendung verschiedener bakterieller Expressionssysteme oder *E.*

coli-Stämme, durch veränderte Induktionszeiten und Kultivierungstemperaturen, sind fehl geschlagen. Das gewünschte Protein lag in allen Versuchen als inaktives, aggregiertes Faltungsinter-mediat in den Zellen vor.

Um das CbfA²⁻³⁷⁰-Protein für weitere funktionelle Analysen zu erhalten, war die Aufreinigung aus bakteriellen Expressionssystemen ausschließlich unter denaturierenden Bedingungen möglich. Für dieses Verfahren konnte nur das mit einem Histidinhexamer versehene Fusionsprotein (His)₆-CbfA²⁻³⁷⁰ verwendet werden, da durch die denaturierende Methode das MBP-Protein als Affinitäts-tag unbrauchbar wäre. In der folgenden Abbildung wird eine über das *Batch*-Verfahren angefertigte Aufreinigung aus einer 50 ml Expressionskultur in einem Coomassie-Gel und eine Analyse der Elutionsfraktionen im *Western-Blot* dargestellt.

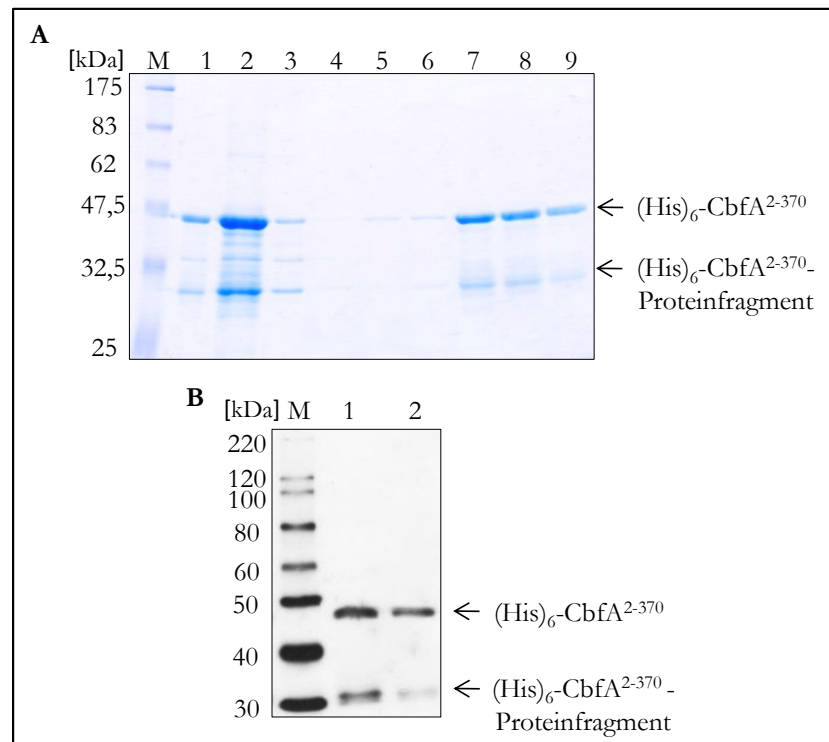


Abbildung 35: Aufreinigung des rekombinanten, in 6 M GuHCl denaturierten (His)₆-CbfA²⁻³⁷⁰ aus BL21-CodonPlus (DE3)-Zellen (A) und *Western-Blot*-Analyse der Elution (B).

A: M: *prestained protein marker* (NEB); Spur 1: Überstand vom Lysatpellet, das für 1 h in 6 M GuHCl gelöst wurde; Spur 2: Überstand vom Lysatpellet nach weiteren 4 h in 6 M GuHCl; Spur 3: Überstand nach Bindung an Ni²⁺-NTA; Spur 4 und 5: Waschschrirte; Spur 6-8 Elution, Spur 9: nicht eluiertes Protein.

B: M: *Magic Mark* (Invitrogen); Spur 1 und 2: beide Elutionsfraktionen der Aufreinigung aus A; detektiert mit Anti-CbfA 3H7.

Für die Solubilisierung aller Proteine und *inclusion bodies* war ein Puffer, der Guanidinhydrochlorid (GuHCl) als Denaturanz enthielt, eingesetzt worden. Im Teil A der Abbildung 35 wird in Spur 1 und 2 gezeigt, dass eine mehrstündige Inkubation der unlöslichen Proteinfraction in einer GuHCl-Lösung für eine vollständige Strukturauflösung

Ergebnisse

notwendig war. Die folgende Isolierung des Zielproteins konnte durch die Verwendung der Affinitätschromatographie über das Histidinhexamer stattfinden. In Spur 7 und 8 sind die Elutionsfraktionen aufgetragen worden, die durch Absenken des pH-Wertes im GuHCl-Puffer gewonnen wurden. In diesen Proteinlösungen lag das Zielprotein bei einer Masse von 48,2 kDa vor. Alle weiteren Proteine wurden in den Waschschritten entfernt, da diese keine Affinität zu Nickel aufwiesen. Spur 9 zeigt die noch an der Nickelmatrix verbleibende, nicht eluierte Proteinmenge.

Wie in Spur 7 und 8 zu sehen ist, befand sich in der Elution neben dem Zielprotein ein weiteres Protein mit einer Masse von circa 30 kDa. Wahrscheinlich handelte es sich hier um einen Proteinabbruch. Um diese Annahme zu klären, ist eine *Western-Blot*-Analyse der Elutionsfraktionen durchgeführt worden. Das aufgetragene Protein wurde mittels eines CbfA-Antikörpers detektiert. Im Teil B der Abbildung 35 kann die Vermutung bestätigt werden, da der CbfA-Antikörper 3H7, dessen Epitop im Bereich der JmjC-Domäne lag, nicht nur das Zielprotein sondern ebenfalls das Abbruchfragment erkannte. Dieser Proteinabbruch hätte vermutlich die folgende Rückfaltung des Volllängenproteins behindern können und sollte zunächst beseitigt werden.

Durch eine Veränderung der Lage des Histidin-*tags* vom N-Terminus an den C-Terminus des Zielproteins bestand die Möglichkeit, bei der Aufreinigung das rekombinante Volllängenderivat und nicht den Proteinabbruch zu isolieren. Dies war nur möglich, indem die codierende Sequenz mit Hilfe der Primer CMBF157/158 an dem ursprünglichen Expressionsvektor pET33b(+)-JmjC131/132 amplifiziert und anschließend in den Leervektor pET33b(+) als *NcoI/XhoI*-Fragment kloniert wurde. Diese Klonierung ermöglichte eine induzierbare Transkription und Translation des CbfA⁷⁻³⁷⁰-Proteins beginnend an der siebenten Aminosäure des N-Terminus und endend an Aminosäure 370 fusioniert mit einem Histidinhexamer. Durch die Position des Histidin-*tags* am C-Terminus des Zielproteins sollte nur das gewünschte Fragment in den eluierten Fraktionen der Aufreinigung zu finden sein, was jedoch nicht der Fall gewesen war. Ähnlich der in Abbildung 35 dargestellten Aufreinigung war neben dem Zielprotein von 43,3 kDa ein Protein von ebenfalls 30 kDa eluiert worden (Abbildung 36). Die Überlegung, dass durch eine Klonierung des Histidin-*tags* an den C-Terminus das Proteinfragment nicht gebunden und eluiert wurde, hatte sich nicht bestätigt. Somit fand keine unvollständige Proteinexpression statt, sondern das Volllängenprotein wurde proteolytisch gespalten.

Dass keine extern zugeführte Protease für die Spaltung verantwortlich war, kann durch die Abbildung 36 ebenfalls gezeigt werden.

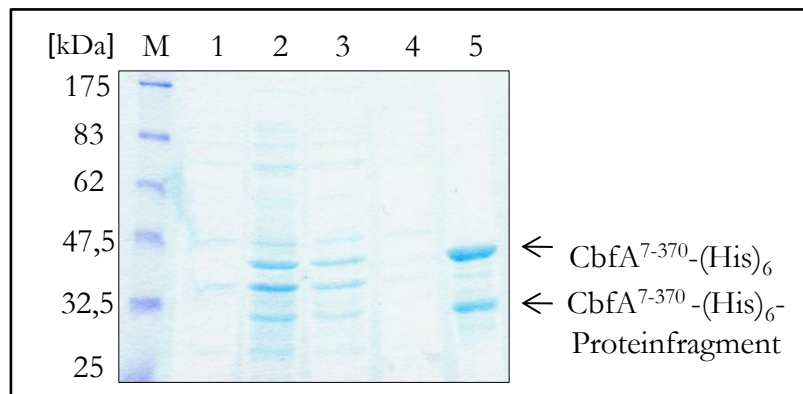


Abbildung 36: Expressionsversuch des Fusionproteins CbfA⁷⁻³⁷⁰-(His)₆ in BL21 CodonPlus-Zellen für 2 h bei 37°C: M: *prestained protein marker* (NEB); Spur 1: nicht induzierte Zellen, Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Zellysat; Spur 4: lösliche Fraktion; Spur 5: unlösliche Fraktion

Die proteolytische Spaltung trat bereits während der Expression auf. Bei einem Vergleich von Spur 1 und 2 fällt auf, dass durch die Zugabe von IPTG nicht nur das gewünschte Protein bei 43,3 kDa exprimiert wurde, sondern auch ein weiteres 30 kDa schweres Protein gebildet wurde. Dieses Protein ist auch im Lysatpellet der Spur 5 wiederzufinden. Es wurde vermutet, dass es sich um dasselbe Proteinfragment handelte, welches in der Aufreinigung zusätzlich eluiert wurde (Abbildung 35A: Spur 6-8 und B: 1-2). Um die genaue Position der Proteinspaltung zu untersuchen, wurde die Elution einer aufgereinigten Bakterienkultur von 50 ml von BL21-CodonPlus-Zellen nach einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert und am Leibniz-Institut für Altersforschung – FLI Jena in der Arbeitsgruppe Biochemie von Prof. Dr. Frank Grosse analysiert. Das unter dem Begriff „Edman-Abbau“ bekannte Verfahren lieferte die Sequenz der N-terminalen Spaltungsstelle. Es ist gelungen, die N-Termini des Volllängenderivats und des Proteinfragments schrittweise zu markieren und abzuspalten, wodurch die Proteinsequenzen chromatographisch identifiziert werden konnten. Für den N-Terminus des Volllängenderivats ist die zu erwartende Aminosäuresequenz -APNSNFIIMS- identifiziert worden, während die N-terminale Proteinsequenz des Fragmentes eine Abfolge von -MKDFISYLQV- aufwies.

Berechnet man die theoretische Masse des Proteinfragmentes ab dem Methionin der analysierten Sequenz, erhält man einen Wert von 34 kDa. Diese theoretische Größe entspricht ungefähr dem Proteinfragment in der Spur 5 der Abbildung 36. Bei der näheren Betrachtung der Aminosäureabfolge des Fragmentes ist zu erkennen, dass sich die Sequenz der JmjC-Domäne innerhalb dieses Proteinbereiches befindet und die Expression dieses Fragmentes ebenfalls die Struktur der JmjC-Domäne beinhalten würde (Abbildung 37).

Ergebnisse

MAPNSNFIIMS	NQPYQTTS	PEIVEDYII	KRGQPFVLT	GTGTTQGWS	RSNMFT	50
LDFLSERYSE	MELINSPRN	NETHTDLQ	GW	RMKDFIS	YLVQSPEERN	PKHL 100
YGKDIACPRE	WQEYLSHKL	QPYQYSYK	SFRDLVSHL	PDYLPETLL	VYIGS	150
NGTYTPGHID	MCGSLSQNL	MVSSDQDA	FAWWFIVP	TEYKDEALK	FWGDKG	200
GDVYNESR	FIRPIDLLG	APFPYVFK	QRPQDFIF	VPPDSVHQ	VVNCGPGI	250
STKVAWNSI	SLKSLPISY	FSSLPHT	RRMAKPEL	FRIKAIAYT	TLRKIMGD	300
VENTNFNTI	DVNDVIDII	APLLEIFH	NIQTESIL	IPKPNYPY	CNGETIP	350
FLQPFKYFN	GDRIQDLE	HHHHHH	*			

Abbildung 37: Aminosäuresequenz des Proteinderivates CbfA⁷⁻³⁷⁰-(His)₆. Rot: Zwischen Arginin (R) und Methionin (M) findet die proteolytische Spaltung statt. Dunkles Blau: Aminosäuresequenz des Proteinfragmentes. Helles Blau: Aminosäuresequenz der JmjC-Domäne von CbfA (AS 114-370).

Um die neue Sequenz, die dem Proteinfragment entspricht, kontrolliert zu exprimieren, ist eine Klonierung durchgeführt worden. Dafür wurde eine PCR an dem Plasmid pET33b(+)JmjC131/132 mit den Primern CMBF158/167 durchgeführt und die amplifizierte 864 bp lange DNA-Sequenz als *NcoI/XbaI*-Fragment in den Leervektor pET33b(+) integriert. Dieses Plasmid codierte das Fusionsprotein CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆, welches eine theoretische Masse von 33,8 kDa besaß. In der folgenden Darstellung ist eine Aufreinigung im großen Maßstab abgebildet. Das Protein ist über eine Ni²⁺-NTA-Säule aus einer 1L-Kultur des RosettaTM-Stammes isoliert worden. Die Fraktionen der Aufreinigung wurden in einem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel nach einer SDS-PAGE dargestellt. In dieser Aufreinigung war es gelungen, aus ca. 2 g Feuchtgewicht der Zellen 23 mg denaturiertes CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ in einem Volumen von vier Milliliter zu isolieren (Abbildung 38).

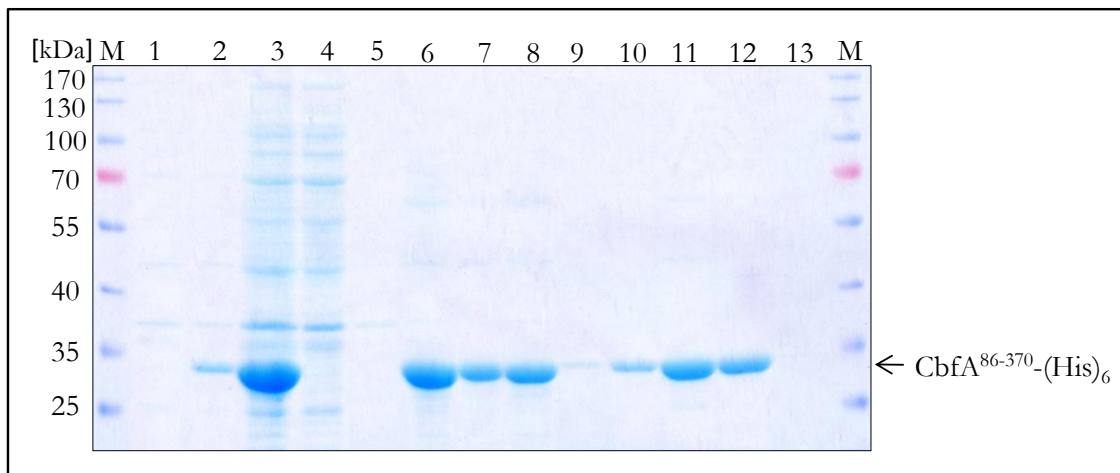


Abbildung 38: Aufreinigung des Proteinderivates CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ aus einer 1L Kultur des RosettaTM-Expressionsstammes von *E. coli*. M: prestained protein marker (Fermentas); Spur 1: nicht induzierte Zellen, Spur 2: induzierte Zellen; Spur 3: Zellysat; Spur 4: lösliche Fraktion nach Zellyse; Spur 5: mit Dounce-Homogenisator behandelte lösliche Fraktion; Spur 6: unlösliche Fraktion nach Zellyse; Spur 7: an Ni²⁺-NTA-Matrix gebundenes, denaturiertes Protein; Spur 8: Durchfluss nach Bindung; Spur 9: Waschschrift; Spur 10: Elution mit pH 5,9; Spur 11 und 12: Elution mit pH 4,5; Spur 13: an Nickelmatrix verbliebenes Protein.

3.6.5 Rückfaltungsversuche des aufgereinigten Proteins CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆

Nachdem das Protein CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ unter Verwendung einer Affinitätschromatographie mit 5,86 mg/ml aufgereinigt werden konnte, sind Rückfaltungsversuche durchgeführt worden. Dafür hatte ein Rückfaltungsscreening von 15 Faltungspuffern, die in ihrer Zusammensetzung unterschiedliche Stabilisatoren in verschiedenen Konzentrationen enthielten und auf je zwei pH-Werte eingestellt waren, stattgefunden (Kapitel 2.3.4). Die Ausgangskonzentration des aufgereinigten CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ betrug für die Rückfaltung 150 µg/ml. Für die Rückfaltung wurde das Verfahren „der schnellen Verdünnung“ unter ständigem Rühren bei einer Temperatur von 4°C angewendet. Um vor der SDS-PAGE einen Eindruck über erfolgreich rückgefaltetes Protein zu erhalten, wurde der Bradford-Tüpfeltest verwendet. Hier konnte bereits bei Puffer 6, 7 und 13 mit dem pH-Wert 10 eine intensive Farbreaktion festgestellt werden.

Das im Teil A der Abbildung 39 dargestellte Screening mit einem pH-Wert von 7,5 zeigt keine renaturierten Proteinbanden. Demnach hat keine Rückfaltung des Proteins in einem der Puffer bei diesem pH-Wert stattgefunden. In der Spur P ist als Größenvergleich denaturiertes Protein dargestellt worden. Im Teil B der Abbildung 39 können unter Pufferbedingung 6, 7 und 13 bei einem pH-Wert von 10 schwache Proteinbanden erkannt werden, was die Aussage des Tüpfeltests bestätigt. Auffallend in der Zusammensetzung der drei Puffer war, dass sie alle den Stabilisator Arginin in einer Konzentration von 0,75 M besaßen.

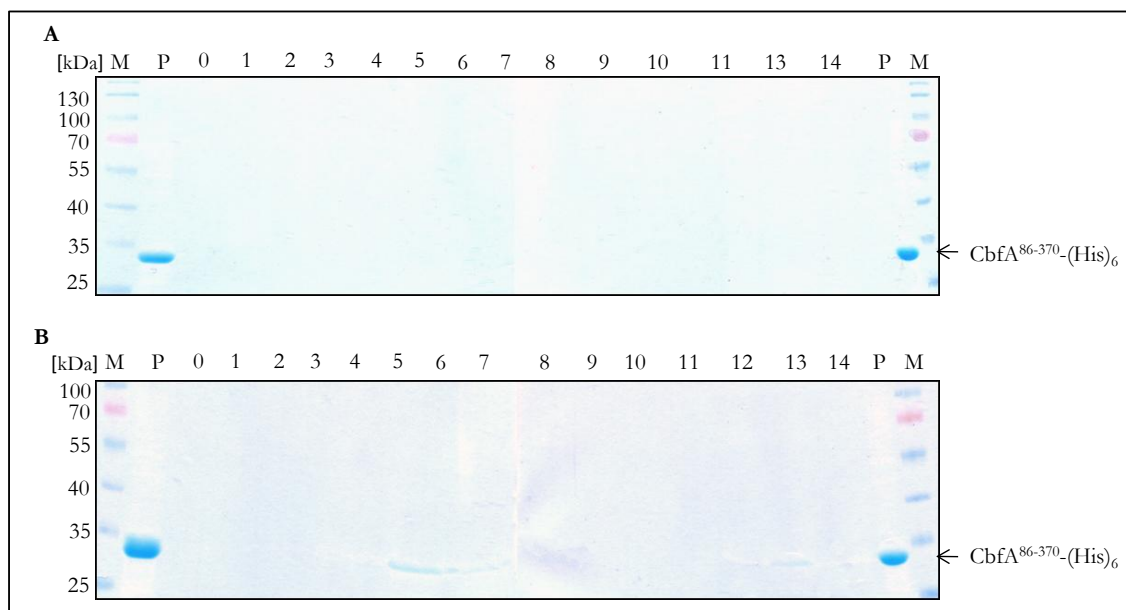


Abbildung 39: Screening von 15 verschiedenen Rückfaltungspuffern bei einem pH-Wert von 7,5 (A) und einem pH-Wert von 10 (B) für die Renaturierung des aufgereinigten CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆. M: *prestained protein marker* (Fermentas); P: TCA gefälltes, denaturiertes Protein als Größenstandard (15 µg); Spur 0-14: renaturiertes Protein in dem jeweiligen Rückfaltungspuffer (Zusammensetzung in Kapitel 2.3.4).

Ergebnisse

Ziel jeder Rückfaltung ist es, das Protein in einen „nativen“ Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) zu überführen, um unter physiologischen Bedingungen Funktionsassays durchführen zu können. In Abbildung 40 ist ein Proteingel mit den Ergebnissen dieser Dialyse abgebildet. Es sind aus den Faltungsansätzen 6, 7 und 13 bei pH 10 die Proteinfraktionen nach der Dialyse aufgetragen worden. Spur 6 zeigt das gewünschte CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Monomer bei 33,8 kDa, während in Spur 7 und 13 neben dem Monomer auch eine sehr schwache Bande bei ca. 67,6 kDa zu erkennen ist, was auf ein Proteindimer hindeutet.

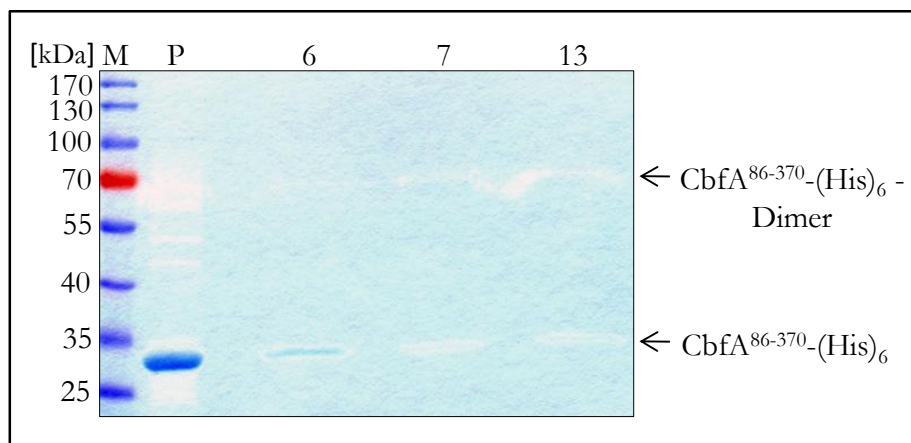


Abbildung 40: Dialysierte Proteinfraktionen gegen einen „nativen“ Puffer aus den Faltungsansätzen 6, 7 und 13. M: *prestained protein marker* (Fermentas); P: TCA gefälltes, denaturiertes Protein als Größenstandard (15 µg); Spur 6, 7 und 13: dialysiertes Protein aus den entsprechenden Faltungsansätzen.

Von den dialysierten Fraktionen ist die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt worden (Bradford, 1976). Es konnte für Bedingung 6 insgesamt 150 µg/ml, 73 µg/ml für Bedingung 7 und für Bedingung 13 insgesamt 65 µg/ml Protein nach der Dialyse gemessen werden.

Weitere Untersuchungen zur Löslichkeit des Proteins nach der Dialyse wurden anhand einer analytischen Größenausschluss-Chromatographie in der Abteilung für Physikalische Biotechnologie der MLU Halle-Wittenberg in Kooperation mit Dr. Constanze Than-Breithaupt durchgeführt. Es sollte damit die Frage geklärt werden, ob das gewünschte Protein als Monomer vorliegt und ob kleine Aggregate, die in Lösung bleiben, dennoch vorhanden sind. In dem Verfahren verteilen sich Proteine entsprechend ihrer Molekülgröße zwischen der stationären und der mobilen Phase. Je kleiner die Proteine sind, desto länger verweilen sie in dem Porensystem der stationären Phase. Für diese Untersuchung wurde das unter der Pufferbedingung 6 (50 mM Tris-HCl, pH 10; 50 mM NaCl; 0,75 M Arginin) renaturierte CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Protein in einer Konzentration von 0,1 mg/ml auf eine Sephadex G-200-Säule analysiert. Das gewünschte Monomer würde bei

einem idealen Laufverhalten ein Elutionsvolumen bei 2,1 ml aufweisen. Die analytische Größenausschluss-Chromatographie wurde zum einen mit dem im Arginin-Puffer befindlichen Protein vor und zum anderen nach der Dialyse gegen einen „nativen“ Puffer durchgeführt. Das Chromatogramm der Abbildung 41A zeigt einen kleinen Peak bei 2,64 ml, der auf das JmjC-Fusionsprotein als Monomer bei einem nicht idealen Laufverhalten schließen lässt. Der Hauptpeak bei 3,44 ml deutet auf ein sehr kleines Molekül hin und könnte dem Arginin entsprechen. Ein anderes Ergebnis ist im Teil B der Darstellung zu sehen. Hier entstand der stärkste Peak, welcher 60 % der aufgetragenen Proteinmenge darstellte, bei einem Volumen von 1,13 ml. Dieses Retentionsvolumen entsprach dem Ausschlussvolumen der Säule, bei dem große Aggregate eluieren. Somit schien ein sehr geringer Teil von 3,5 % des Proteinanteils dem CbfA-Derivat als Monomer bei einem Elutionsvolumen von 2,6 ml zu entsprechen.

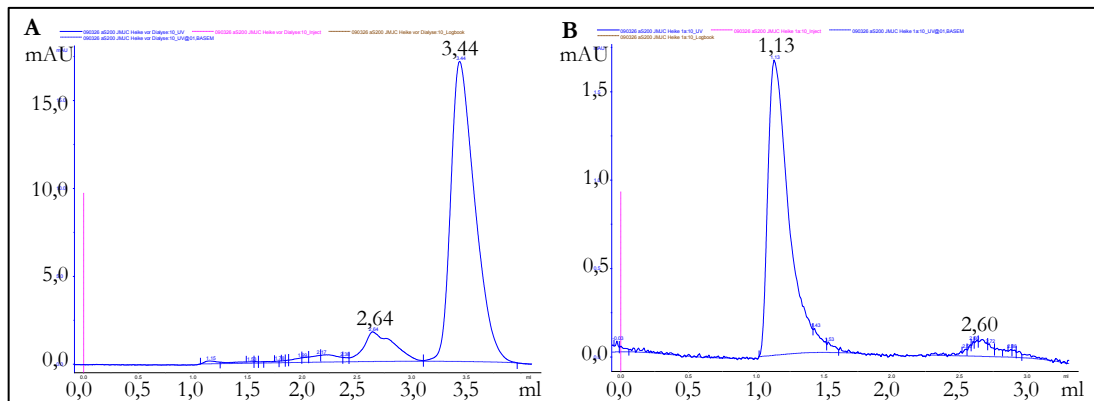


Abbildung 41: Chromatogramme analytischer Größenausschluss-Chromatographie von rückgefaltetes CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ vor (A) und nach (B) der Dialyse gegen einen 150 mM NaCl-Puffer (pH 7,5). Dargestellt wird die Extinktion bei 280 nm in mAU gegen das Ausschlussvolumen von CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ (0,1 mg/ml).

Obwohl nach der SDS-PAGE des dialysierten CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Proteins davon ausgegangen werden konnte, dass das gewünschte Protein in löslicher Form vorlag, zeigte das Chromatogramm der Gelfiltration ein anderes Ergebnis. Das Protein bildete im Dialysepuffer erneut Aggregate und konnte nicht für Untersuchungen der biologischen Aktivität fraktioniert werden. Da für das im Rückfaltungspuffer befindliche CbfA-Derivat die Vermutung bestand, dass es sich bei dem Peak von 2,64 ml (Abbildung 41A) um ein Monomer handelte, wurde ein Versuch unternommen, das Protein direkt auf der Sephadex-Säule umzupuffern. Der verwendete Gelfiltrationspuffer der Säule ist ein Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 7,5, der zusätzlich 150 mM NaCl enthielt. Die Zusammensetzung entsprach der des Dialysepuffers, wodurch im Anschluss gesammelte Fraktionen direkt für Aktivitätsassays zu verwenden wären. Abbildung 42 zeigt das

Ergebnisse

Ergebnis zweier Größenausschluss-Chromatographie-Läufe von CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ mit einer Ausgangskonzentration von 0,1 mg/ml (Teil A) bzw. mit 0,5 mg/ml (Teil B).

Insgesamt wurden in der Größenausschluss-Chromatographie 3 µg (Teil A) und 15 µg (Teil B) des Proteins eingesetzt. Die relevanten Fraktionen konnten in 400 µl Volumina gesammelt und nach einer TCA-Fällung auf einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch getrennt werden. Im Chromatogramm der erstgenannten Konzentration ist ein Peak bei einem Volumen von 2,13 ml verteilt auf Fraktion 3 und 4 zu erkennen (Abbildung 42A). Dies stellt das JmjC-Fusionsprotein ideal nach der Eichung als Monomer dar.

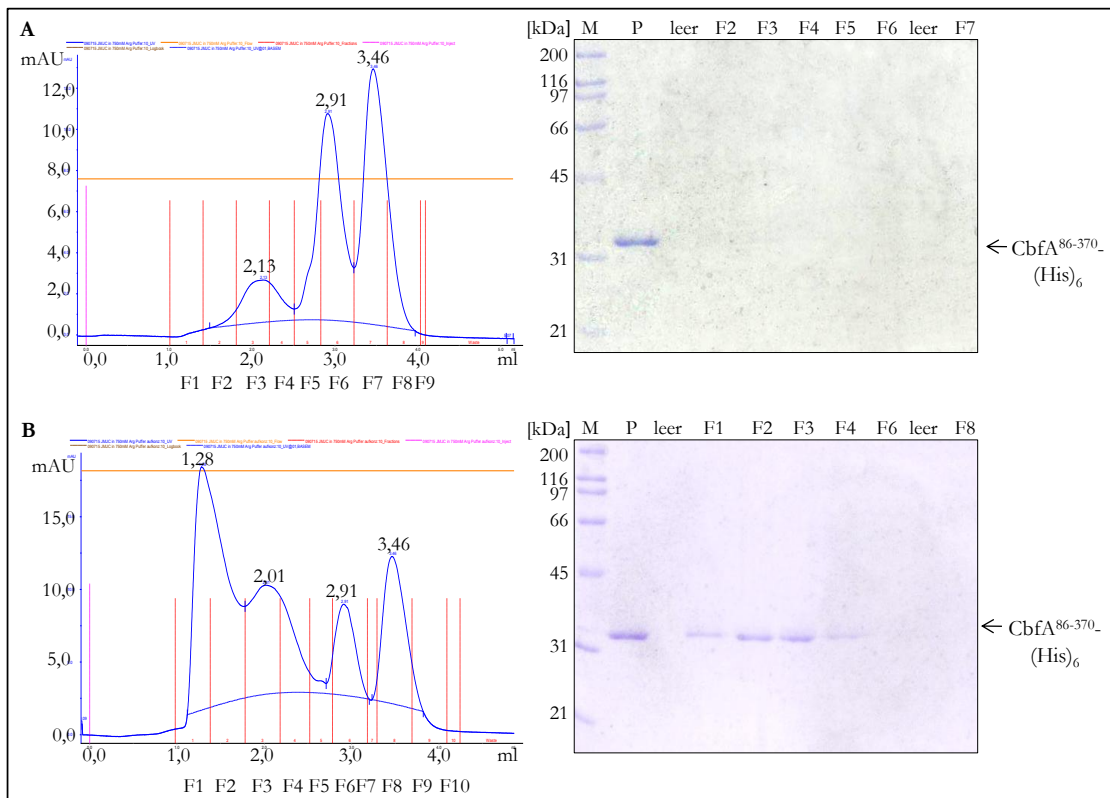


Abbildung 42: Chromatogramme der analytischen Größenausschluss-Chromatographie und Coomassie-gefärbte Polyacrylamid-Gele von Fraktionen des aufgereinigten und rückgefalteten CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Proteins. M: *prestained protein marker*; P: denaturiertes, aufgereinigtes und TCA-gefälltes CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ (3 µg), F: Fraktionen der Gelfiltration.

A: Proteinkonzentration 0,1 mg/ml; 3 µg Protein eingesetzt; neun Fraktionen in 400 µl Volumina gesammelt, TCA gefällt und auf ein 12 %iges PAA-Gel aufgetragen.

B: Proteinkonzentration 0,5 mg/ml; 15 µg Protein eingesetzt; zehn Fraktionen in 400 µl Volumina gesammelt, TCA gefällt und auf ein 12 %iges PAA-Gel aufgetragen.

Zwei weitere Peaks mit den Elutionsvolumina von 2,91 ml und 3,46 ml lassen auf niedermolekulare Verbindungen, beispielsweise das Arginin vom Faltungspuffer, schließen. In der Gelelektrophorese der Fraktionen 3 und 4 sind aufgrund der geringen Proteinkonzentrationen in einem Coomassie-gefärbten Gel keine Banden zu sehen. Nur die Bande des denaturierten Proteins, welches 3 µg beträgt, konnte erkannt werden.

Im Teil B der Darstellung ist nach Aufkonzentrieren der Proteinlösung auf 0,5 mg/ml eine weitere Analyse durchgeführt worden. In diesem Chromatogramm entstand ein Hauptpeak bei 1,28 ml Ausschlussvolumen, was auf Proteinaggregate hindeutete. Der zweite Peak bei 2,01 ml stellte das gewünschte Protein dar. Da sich beide Peaks in Fraktion 2 und 3 überlappten, entstand ein Gemisch von Proteinaggregaten und Proteinmonomeren. Der dritte und vierte Peak entsprachen denselben Elutionsvolumina, wie im Chromatogramm von Teil A der Abbildung 42, und schienen ähnliche niedermolekulare Verbindungen zu enthalten. Die Analyse der Fraktionen mittels Gelelektrophorese zeigte neben dem denaturierten CbfA-Derivat, das als Größenstandard dienen sollte, weitere Banden bei 34 kDa. Damit wurde die Vermutung bestätigt, dass es sich in Fraktion 1-4 um das CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Protein handelte. Die Proteinbanden der Fraktionen 1 und 2 entsprachen aggregierten Proteinpolymeren, die in den Fraktionen 3 und 4 Proteinmonomeren von CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆. Die Bandenstärke der Aggregate bzw. der Monomere schien mehr als 3 µg zu betragen. Fraktion 6 und 8 der Gelabbildung weisen keine Proteinbanden auf. Die Annahme, dass es sich um Pufferkomponenten handelte, wurde somit bestätigt.

Obwohl eine Abtrennung des löslichen CbfA-Derivates bei niedriger Proteinkonzentration erfolgreich durchgeführt werden konnte, reichte eine Proteinkonzentration von weniger als 0,1 mg/ml nicht für weitere funktionelle *Assays* aus. Bereits eine leichte Aufkonzentration des Proteins auf 0,5 mg/ml hatte zum erneuten Aggregieren des Proteins geführt. In weiteren Versuchen sollte durch veränderte Faltungs- und Chromatographie-Bedingungen eine Verringerung des aggregierten Anteils bzw. eine Trennung von aggregierten und löslichen Proteinanteilen im konzentrierteren Zustand erfolgen. Zum einen wurde die Rückfaltung unter einer Arginkonzentration von 1,5 M durchgeführt, zum anderen sollte ein Säulenpuffer mit einer höheren Natriumchlorid-Konzentration von 300 mM eingesetzt werden.

Wie in Abbildung 43 zu sehen ist, wurde unter beiden Bedingungen ein Gemisch aus Aggregaten und Monomeren detektiert. Das Proteinaggregat eluierte im Ausschlussvolumen nach 1,29 ml bzw. 1,31 ml, während das lösliche CbfA-Derivat mit einem Elutionsvolumen von 2,10 ml bzw. 2,06 ml eluierte. Auch hier wurden wieder niedermolekulare Verbindungen, die vermutlich dem Arginin zu zuordnen sind, bei einem Volumen von 2,90-2,95 ml und bei 3,46-3,50 ml festgestellt. Nachdem die analytische Größenausschluss-Chromatographie unter modifizierten Bedingungen stattgefunden hatte, konnte in keinem Versuch eine gute Abtrennung des löslichen Proteinanteils isoliert von aggregiertem Protein erfolgen. Die Verwendung des höher molekularen Gelfiltrationspuffers konnte allerdings den relevanten Anteil an löslichem CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆ in Bezug auf

Ergebnisse

die Proteinaggregate positiv beeinflussen, so dass hier Aggregate und Monomere nahezu in gleichen Mengen vorlagen.

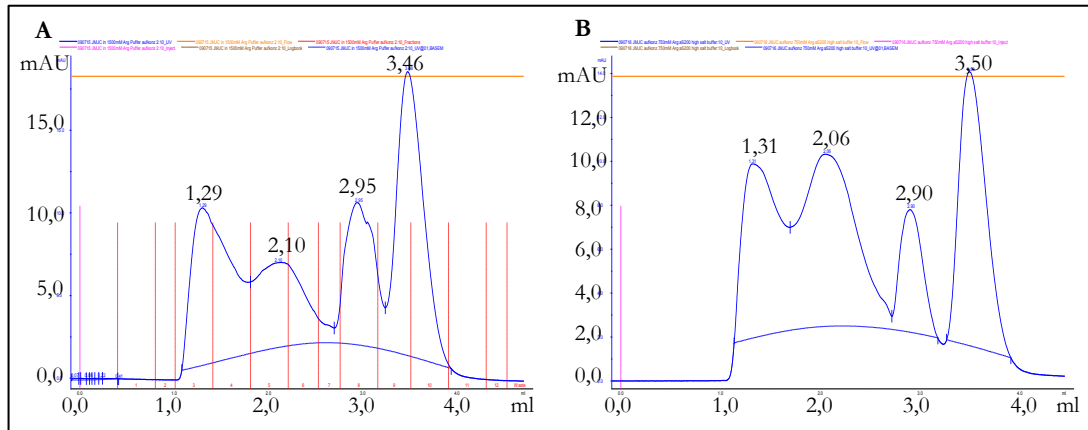


Abbildung 43: Chromatogramme der analytischen Größenausschluss-Chromatographie unter modifizierten Bedingungen des aufgereinigten und rückgefalteten CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Proteins. A: Rückfaltung in 50 mM Tris-HCl, pH 10; 50 mM NaCl; 1,5 M Arginin; Säulenpuffer: Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl. **B:** Rückfaltung in 50 mM Tris-HCl, pH 10; 50 mM NaCl; 0,75 M Arginin; Säulenpuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 300 mM NaCl.

Da trotz veränderter Bedingungen von Rückfaltung und Gelfiltration keine Fraktionierung des löslichen CbfA⁸⁶⁻³⁷⁰-(His)₆-Monomeres in einer lohnenden Konzentration erfolgten, wurden ab diesem Punkt keine weiterführenden Versuche unternommen, die Größenausschluss-Chromatographie zu optimieren. Die Herstellung des rekombinanten Proteins der JmjC-Domäne von CbfA für folgende funktionelle und kristallographische Untersuchungen konnte im Zeitrahmen dieser Arbeit aufgrund der starken Aggregationsneigung des rückgefalteten Proteins bei höheren Konzentrationen und der erschwerten Isolierung des Proteins aus Faltungsansätzen nicht zu Ende geführt werden. Nur durch umfangreiche Optimierungsversuche besteht die Möglichkeit, das Protein in einem funktionellen Zustand zu erhalten.

3.6.6 Suche nach Interaktionspartnern der JmjC-Domäne von CbfA

Die physiologische Funktion eines Proteins kann durch die Interaktion mit einem weiteren Protein erweitert oder verändert werden. Durch Protein-Protein-Interaktionen können beispielsweise Konformationsänderungen der Interaktionspartner erfolgen, die mit Funktionsänderungen der Proteine einhergehen. Die Identifizierung von Interaktionspartnern mit der JmjC-Domäne von CbfA kann daher zur Aufklärung der biologischen Bedeutung des Transkriptionsregulators beitragen.

Um Interaktionen von Proteinen zu untersuchen, wurde auf das Hefe-Zwei-Hybrid-System zurückgegriffen. Dabei wurde ein *Mating* zweier unterschiedlicher Paarungstypen, denen zuvor verschiedene Plasmide transformiert worden waren, in *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Das *Bait*-Plasmid pGBKT7-JmjC131/132 codierte für die JmjC-Domäne, während das *Prey*-Plasmid pGADT7-Rec je eine cDNA einer *D. discoideum* cDNA-Banken enthielt. Fand eine Protein-Protein-Interaktion statt, waren die resultierenden Zygoten in der Lage, Reportergene zu aktivieren, die das Wachstum auf Selektionsmedium ermöglichten.

In dieser Arbeit wurden zwei *Matings* mit unterschiedlich hergestellten cDNA-Banken durchgeführt. Während für eine cDNA-Bibliothek ein - oligo(dT) - Primer in der Erststrangsynthese verwendet wurde, ist in der Herstellung der zweiten Bank ein mit sechs zufälligen Nukleotiden endender Primer - (dN)₆ - eingesetzt worden. Beide *Matings* wurden mit den Stämmen AH109 und Y187 unter Verwendung einer vierfachen Selektion (Leu⁻, Trp⁻, His⁻, Ade⁻) durchgeführt.

Die im AH109 x Y187-Hintergrund wachsenden diploiden Zellen konnten anschließend weiteren Analysen unterzogen werden. Nachdem die verschiedenen Plasmid-DNAs der Zygoten isoliert und durch einen Restriktionsverdau überprüft waren, wurde die Interaktion durch vier unabhängige Retransformationen dieser Plasmide in Hefe wiederholt und ein Test auf Selbstaktivierung auf selektivem Medium durchgeführt. Desweiteren konnte die Enzymaktivität der α -Galaktosidase, deren *MEL1*-Gen ebenfalls unter der Kontrolle des *GAL4*-Promotors stand, verwendet werden.

In Abbildung 44 sind zwei Interaktionsbeispiele dargestellt. Teil A der Abbildung zeigt eine positive Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Fusionsprotein des *Bait*-Plasmides, das für die JmjC-Domäne codierte, und einem unbekannten Fusionsproteins. Außerdem ist keine Selbstaktivierung durch dieses Fusionsproteins zu erkennen, da die Bereiche 6-9 kein Wachstum und keine α -Galaktosidaseaktivität präsentierten. Im Teil B dieser Abbildung wird eine Protein-Protein-Interaktion dargestellt, dessen Fusionsprotein des *Prey*-Plasmides allein in der Lage war, den *GAL4*-Promotor zu aktivieren und dadurch die Reportergene

Ergebnisse

zu exprimieren. Die Bereiche 6-9 waren bewachsen und wiesen eine leichte Blaufärbung auf, was auf eine α -Galaktosidaseaktivität hindeutete.

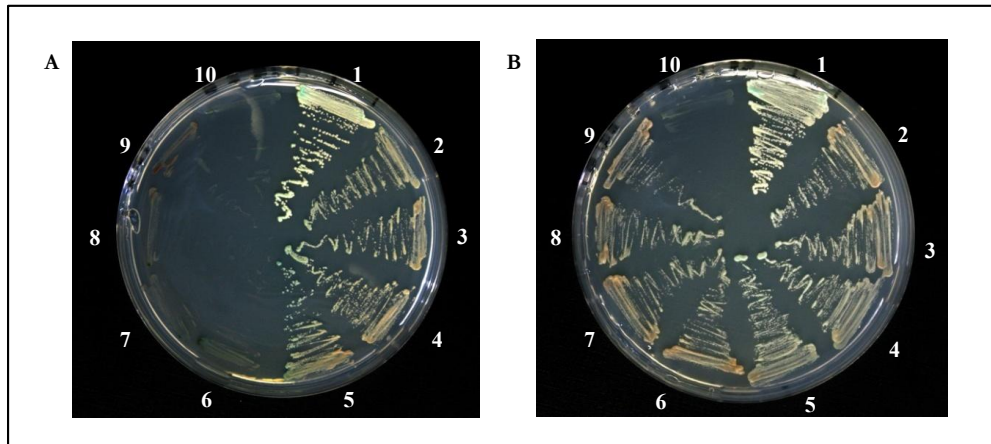


Abbildung 44: Exemplarische Darstellungen des Interaktionsassays in dem Hefestamm AH109. **A:** positive Protein-Protein-Interaktion (*Mating2#40*) **B:** Selbstaktivierende Interaktion (*Mating2#58*). 1: Positivkontrolle (J. Lucas, 2009); 2-5: vier Interaktionsreplikate; 6-9: vier Selbstaktivierungsreplikate; 10: Negativkontrolle (J. Lucas, 2009).

Die Ergebnisse und Parameter der beiden *Matings* sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst. In beiden *Matings* wurden $2,5 \times 10^6$ bzw. $2,9 \times 10^6$ Zygoten auf Protein-Protein-Interaktionen analysiert. Die für ein *Mating* geforderte Zygoteneffizienz von 2 % ist in beiden Screenings erreicht worden. Im Vergleich beider *Matings* fiel auf, dass die Zygotenanzahl und die Effizienz im Screening mit der „random primers“ hergestellten cDNA-Bank effektiver war.

Tabelle 4: Ergebnisse beider *Matings* und anschließender Selektion auf die Auxotrophie-marker Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin.

<i>Mating</i>	Bank	Zygoten	Effizienz	Kolonienbild.	α -Gal.-Akt.	Kein Selbstakt.
1	oligo (dT)	$2,5 \times 10^6$	15,75%	44 Kolonien	25 Kolonien	14 Kolonien
2	(dN) ₆	$2,9 \times 10^6$	19,33%	155 Kolonien	86 Kolonien	44 Kolonien

Wie aus der Tabelle 4 zu entnehmen ist, waren im ersten *Mating*, in dem 25 von 44 Kolonien eine α -Galaktosidaseaktivität gezeigt hatten, 14 nicht selbstaktivierend, während im zweiten *Mating* 44 Kolonien eine α -Galaktosidaseaktivität besaßen und keine Selbstaktivierung aufwiesen. Diese Interaktionen waren nach den geforderten Kontrollen im Rahmen des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems als korrekt zu betrachten. Im Anschluss wurden die cDNA-Sequenzen der *Prey*-Plasmide sequenziert und durch einen Vergleich mit der *DictyBase*-Datenbank (Fey *et al.*, 2008) identifiziert. Ein Überblick der gefundenen cDNAs des ersten *Matings* wird in Tabelle 5 gegeben.

Tabelle 5: Liste der im ersten Hefe-*Mating* gefundenen, codierenden DNA-Sequenzen und deren Genprodukte. *Gene ID**: Genidentifikationsnummer einer cDNA-Sequenz.

Klon	<i>Gene ID*</i>	cDNA Größe	Genname	Genprodukt
1	DDB_G0273623	253 bp	<i>hspE-2</i>	<i>Heat shock cognate protein</i> Hsc70-2
2	DDB_G0292150	659 bp	<i>ak1</i>	vermeintliche Protein Serin/Threonin Kinase
5	DDB_G0281547	351 bp	<i>amyA</i>	vermeintliche Alpha-Amylase
6	DDB_G0276105	555 bp	<i>gtr2</i>	<i>Alpha Amylase domain-containing protein</i>
7	DDB_G0281605	427 bp	<i>cfaD</i>	<i>Counting factor associated protein</i>
9	DDB_G0272106	477 bp	<i>arpB</i>	<i>actin related protein 2</i>
12	DDB_G0283755	600 bp	<i>arpC</i>	<i>actin related protein 3</i>
14	DDB_G0269234	390 bp	<i>act8</i>	Aktin
15	DDB_G0289005	501 bp	<i>act4</i>	Aktin
17	DDB_G0267356	820 bp	—	<i>putative reverse transcriptase and protease (skipper LTR-retrotransposon)</i>
18	DDB_G0272030	207 bp	—	—
19	DDB_G0283755	510 bp	<i>arpC</i>	<i>actin related protein 3</i>
27	DDB_G0275299	441 bp	<i>cln5</i>	—
35	DDB_G0277569	220 bp	—	<i>GNS1/SUR4 family protein</i>

Keines der im ersten Hefe-Screening gefundenen Genprodukte stellte ein kernständiges Protein dar. Sequenzen, die für Aktin oder das Aktin-assoziierte Protein Arp3 codierten, waren zweimal gefunden worden, während die resultierenden Proteine alle anderen Sequenzen nur einmal zu einer Interaktion geführt hatten. Zu diesen Proteinen zählten unter anderen ein Hitzeschockprotein, das Aktin-assoziierte Protein Arp2 und Proteine des Retrotransposons Skipper.

Von den 44 möglichen Interaktionspartnern des zweiten Screenings waren 36 Sequenzen auswertbar. Die Analyse der gefundenen Sequenzen des zweiten *Matings* identifizierte Proteine, die bereits im ersten Screening entdeckt wurden, aber auch neue potentielle Interaktionspartner, zu denen die kernständige Histon H3 Lysin 4 Methyltransferase Set1 zählte. Alle weiteren Proteine gehörten entweder dem Zytoskelett an oder sind Bestandteile des Zytoplasmas, der Mitochondrien, von Vesikeln oder des Arp2/3-Komplexes.

Wie in Tabelle 6 zu erkennen ist, interagierten auch in diesem *Mating* einige Proteine mehrfach mit der JmjC-Domäne. Dazu gehörten die Phosphomannomutase mit drei Klonen und Aktin mit 10 Klonen.

Ergebnisse

Tabelle 6 Liste der im zweiten Hefe-Screening gefundenen cDNA-Sequenzen und deren Genprodukte. *Gene ID**: Genidentifizierungsnummer der cDNA-Sequenzen.

Klon	<i>Gene ID*</i>	cDNA Größe	Genname	Genprodukt
1	DDB_G0279289	324 bp	<i>pnmA</i>	Phosphomannomutase
4	DDB_G0287803	447 bp	<i>argS2</i>	Arginyl-tRNA Synthetase
5	DDB_G0284363	261 bp	<i>cf60</i>	Komponente des <i>counting factor-complex</i>
6	DDB_G0279289	324 bp	<i>pnmA</i>	Phosphomannomutase
8	DDB_G0288879	495 bp	<i>act11</i>	Aktin
9	DDB_G0289005	620 bp	<i>act4</i>	Aktin
10	DDB_G0279717	488 bp	—	Carboxylesterase (Typ B Familie)
13	DDB_G0281823	420 bp	<i>v4-7</i>	<i>Peptidase S8 and S53 domain containing ptroin</i>
15	DDB_G0287127	324 bp	<i>vatA</i>	vakuläre ATPase Untereinheit A
22	DDB_G0281255	419 bp	<i>sec24</i>	putatives Transportprotein
25	DDB_G0279289	424 bp	<i>pnmA</i>	Phosphomannomutase
28	DDB_G0293828	654 bp	—	—
29	DDB_G0279591	422 bp	<i>glnA3</i>	<i>Glutamin-ammonia ligase</i>
33	DDB_G0272520	516 bp	<i>act15</i>	Aktin
34	DDB_G0276305	442 bp	—	Aldehyd-Dehydrogenase
38	DDB_G0274129	446 bp	<i>act12</i>	Aktin
40	DDB_G0289257	484 bp	<i>set1</i>	<i>SET domain containing protein, Histone H3 Lysine 4 Methyltransferase</i>
45	DDB_G0267382	277 bp	<i>corA</i>	Coronin
50	DDB_G0277629	329 bp	<i>rpl7a</i>	60S-ribosomales Protein L7a
51	DDB_G0289005	495 bp	<i>act4</i>	Aktin
52	DDB_G0274129	597 bp	<i>act12</i>	Aktin
53	DDB_G0291856	mehrere	<i>gerD</i>	<i>germination protein</i>
54	DDB_G0281255	527 bp	<i>sec24</i>	putatives Transportprotein
55	DDB_G0269234	650 bp	<i>act8</i>	Aktin
57	DDB_G0289593	204 bp	<i>tufM</i>	<i>elongation factor Tu domain containing protein, mitochondrial</i>
60	DDB_G0269098	331 bp	—	multifunktionelles Protein (gag), Retrotransposables Element
61	DDB_G0268966	238 bp	<i>lip1</i>	Mitglied der Lipase-Familie
62	DDB_G0290333	387 bp	—	putatives Physarolisin
63	DDB_0274599	493 bp	<i>act13</i>	Aktin
65	DDB_G0286359	558 bp	<i>svkA</i>	Serverin-Kinase (STE20 Protein-Kinase-Familie)
68	DDB_G0277047	337 bp	—	—
70	DDB_G0274599	336 bp	<i>act13</i>	Aktin
72	DDB_G0291239	623 bp	<i>ubpA</i>	<i>UBP-type zinc finger-containing protein</i>
79	DDB_G0288879	245 bp	<i>act11</i>	Aktin
80	DDB_G0286355	260 bp	<i>mbcA</i>	schwere Kette des Myosins (Klasse II)

3.6.7 Nähere Untersuchungen des Interaktionspartners Aktin im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Im Genom von *D. discoideum* sind 32 Aktogene vorhanden, wovon 17 (*act1-2,4-16,19-21*) als Aktin8-Gruppe zusammengefasst werden und für ein identisches Aktinprotein codieren (Joseph *et al.*, 2008). Dieses Protein besteht aus 376 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 41,7 kDa. Aktin wurde in beiden Hefe-Screenings der JmjC-Domäne gegen *D. discoideum*-cDNA-Banken zwölfmal als Interaktionspartner gefunden. Nach neuesten Untersuchungen fungiert Aktin auch im Zellkern (Bettinger *et al.*, 2004) und wurde daher als Interaktionspartner näher analysiert. Um eine genaue Angabe der Interaktionsfläche zu erhalten, wurden die von den cDNA-Sequenzen codierenden Proteinsequenzen des Aktins in einem Multialignment verglichen (Abbildung 46). Die Bereiche zwischen Aminosäure 164 und 201 sowie zwischen 211 bis 322 verwiesen in allen Sequenzen, mit Ausnahme der codierenden Proteinsequenz von Aktin 12, auf eine identische Aminosäureabfolge. Eine nähere Betrachtung der Proteinstruktur dieser Abschnitte konnte zeigen, dass fünf α -Helices diese Bereiche dominieren (Abbildung 45).

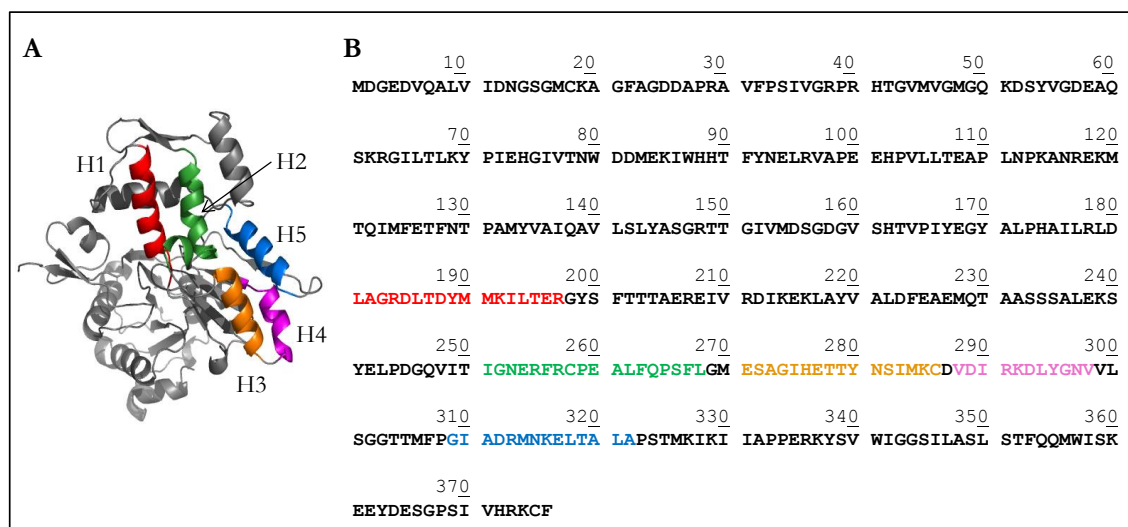


Abbildung 45: Dreidimensionale Struktur (A) und Proteinsequenz (B) des *D. discoideum* Aktin 1 (Swiss Prot P07830). Farbige Darstellung der Proteinsequenzen von fünf α -Helices (H1-H5).

Die erste Helix wurde von AS 181-198, die zweite von AS 251-268 und die dritte Helix von AS 271-286 gebildet. Die vierte und fünfte Helix wurden schließlich in den Aminosäurebereichen 288-298 bzw. 309-322 konserviert. Da in allen gefundenen cDNA-Sequenzen mindestens eine Helixstruktur codiert wurde, bestand die Möglichkeit, dass diese als Interaktionsflächen dienen konnten.

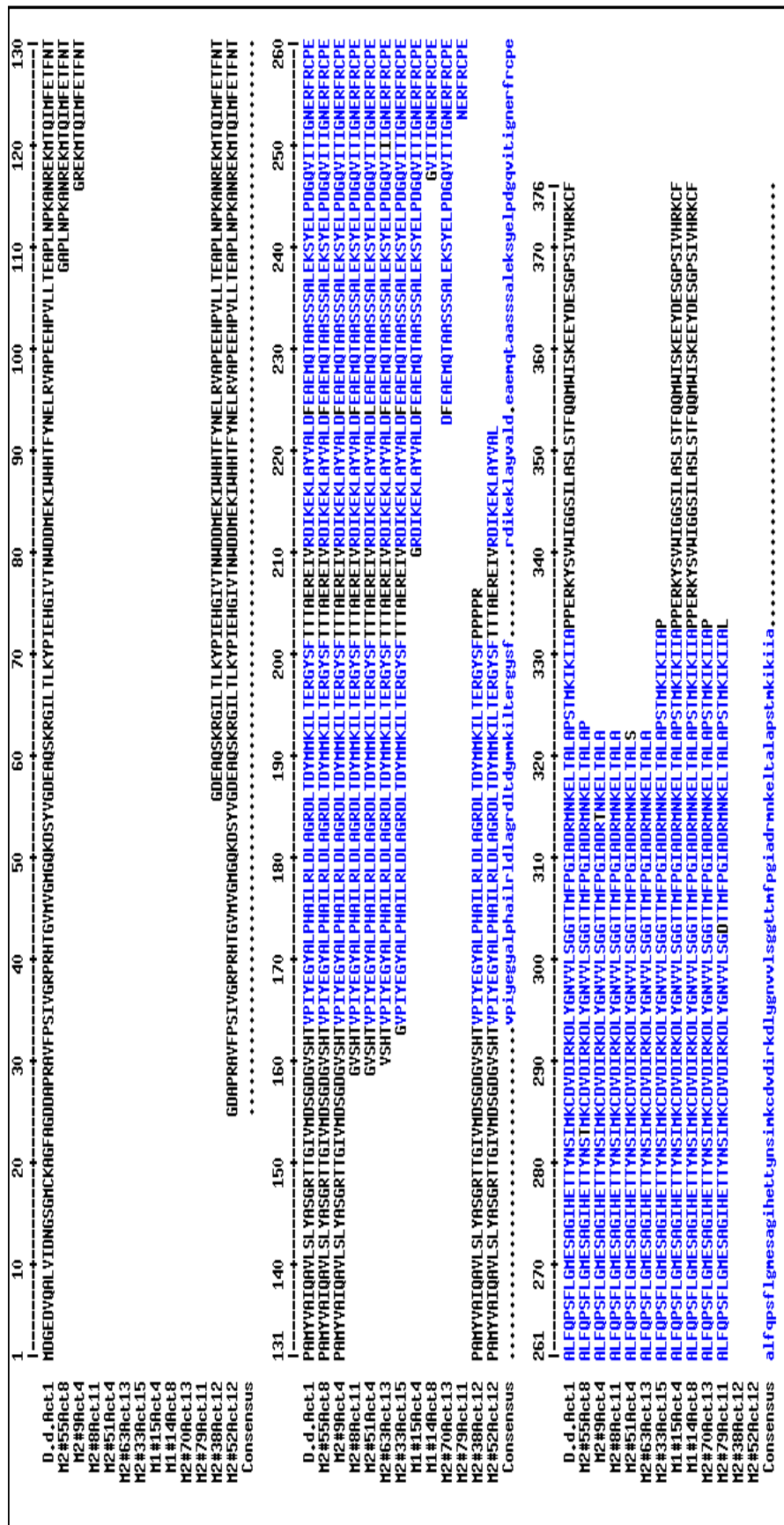


Abbildung 46: Multialignment aller im Hefe-Screening gefundenen Proteinsequenzen von Aktin. D.d.Act1: *D. discoideum* Proteinsequenz von Aktin 1; M2#55: Klon 55 aus dem zweiten Mating mit der Proteinsequenz von Aktin 8.

Zur Untersuchung dieser Annahme wurden durch Klonierungen und Doppelstrang-Mutagenesen die Helices separiert (Abbildung 47).

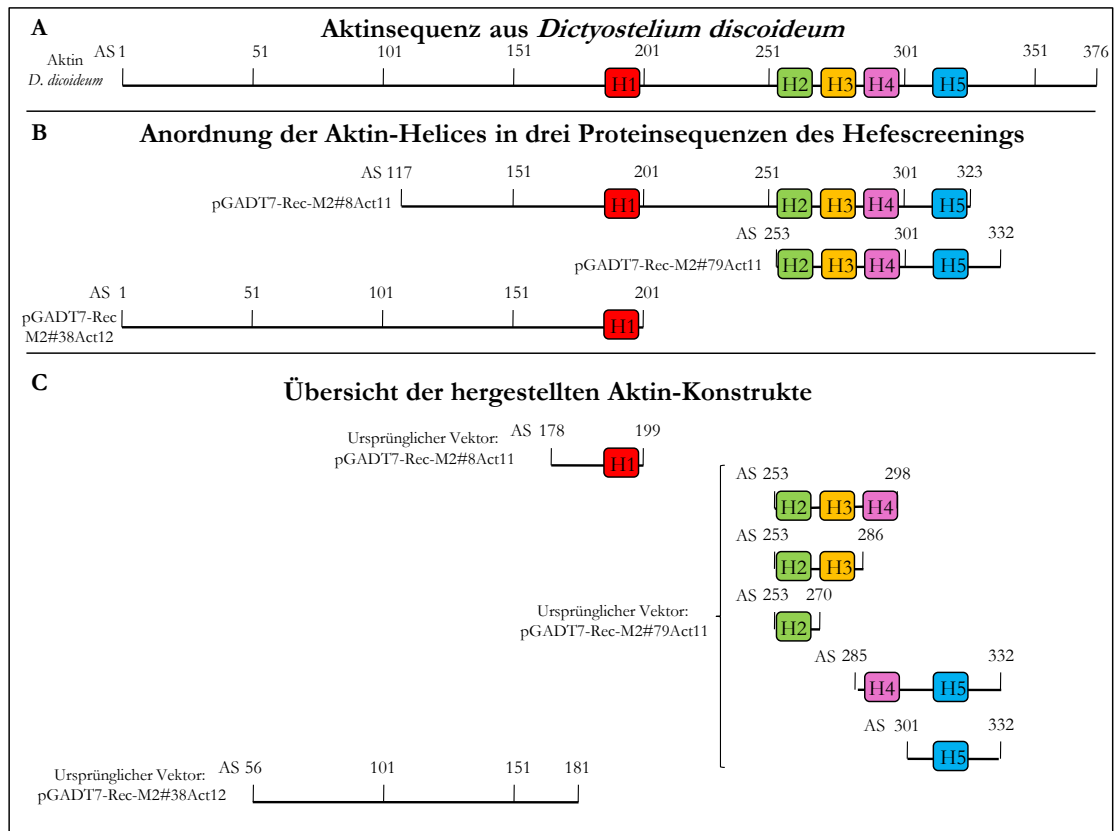


Abbildung 47: Proteinschema unterschiedlicher Aktin-Konstrukte. **A:** Proteinsequenz von Aktin aus *D. discoideum*; **B:** drei Aktin-Interaktionspartner aus Screenings mittels dem Hefe-Zwei-Hybrid-System; **C:** durch Mutagenesen hergestellte Helixkonstrukte von Aktin.

Dafür wurde aus dem zweiten *Mating* der Klon 8, dessen Plasmid Aktin 11 codierte, verwendet. Für die Isolierung der ersten Helix wurde der Bereich zwischen Aminosäure 178 und 199 mit den Primern Act11-01/02 an dem Konstrukt pGADT7-Rec-M2#8Act11 amplifiziert und in den Vektor pGADT7 eingefügt. Die zweite, dritte und vierte Helix wurden durch das sukzessive Einführen eines Translations-Stopcodons (TAA) im Plasmid pGADT7-Rec-M2#79Act11 unter Verwendung der Oligonukleotide Act11-03 bis Act11-08 getrennt. Die entstandenen Konstrukte wiesen eine Kombination der Helices zwei bis vier, zwei bis drei sowie die einzelne Helix zwei auf. Für die gemeinsame Isolierung der vierten und fünften sowie der fünften Helix allein waren wiederum Klonierungen durchgeführt worden. Dabei wurden die Primer Act11-09/10 und Act11-11/12 verwendet und das amplifizierte PCR-Produkt in den Vektor pGADT7 kloniert. Weiterhin konnte ein Konstrukt erstellt werden, dem keine Helix zugehörig war. Dafür wurde der Vektor pGADT7-Rec aus dem zweiten Mating, dessen Insert die cDNA von Klon 38 enthält (pGADT7-Rec-M2#38Act12), verwendet. Dieses Plasmid codierte für den Bereich

Ergebnisse

zwischen Aminosäure 56 und 181 von Aktin 12. Durch die Verwendung der Primer Act12-01/02 konnte das 412 bp lange PCR-Produkt amplifiziert und in den Vektor pGADT7 kloniert werden.

Alle Plasmidkonstrukte sind anschließend sequenziert und durch Doppeltransformationen mit dem Plasmid pGBKT7-JmjC131/132 im Hefe-Zwei-Hybrid-System unter den *Mating*-Bedingungen getestet worden (Abbildung 48).

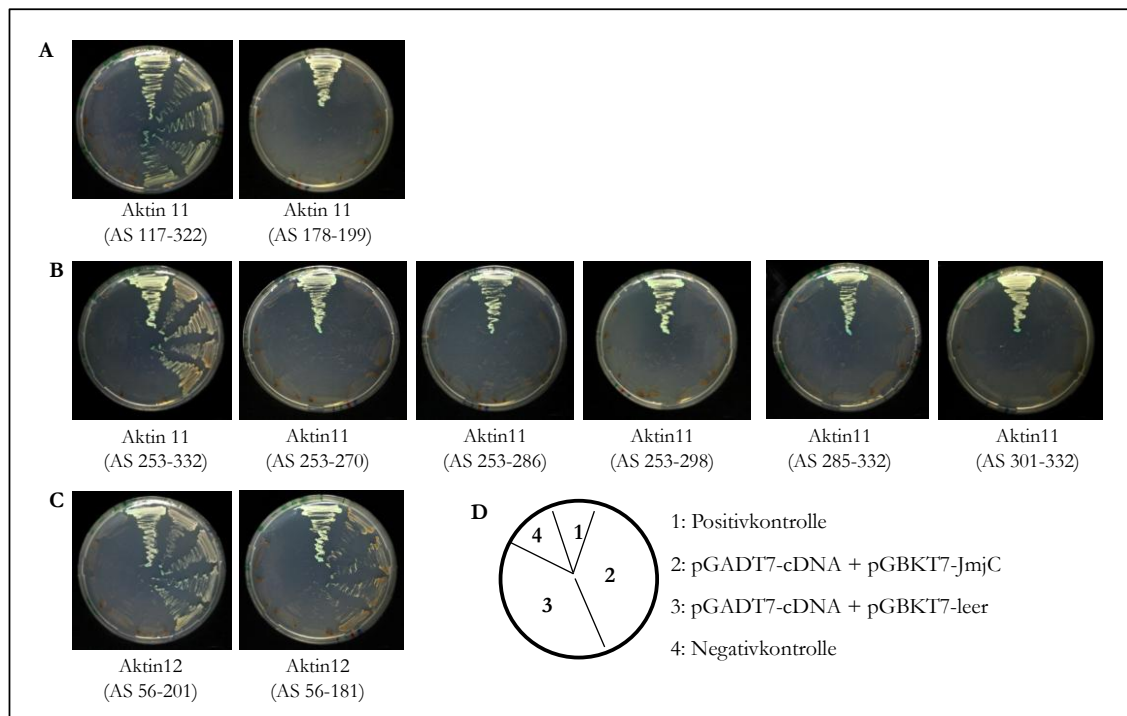


Abbildung 48: Interaktionsassay der JmjC-Domäne mit verschiedenen Aktinkonstrukten im Hefe-Zwei-Hybrid-System. **A:** Aktin 11 der cDNA aus Mating 2 von Klon 8 und dessen Aktinkonstrukt der ersten Helix (AS 178-199); **B:** Aktin 11 der cDNA aus dem zweiten Mating von Klon 79 und dessen Helixkonstrukte H2 (AS 253-270), H2+3 (AS 253-286), H2+3+4 (AS 253-298), H4+5 (AS 285-332), H5 (AS 301-332); **C:** Aktin 12 der cDNA aus dem zweiten Mating von Klon 38 und dessen verkürztes Konstrukt ohne eine Helix; **D:** Schema der aufgetragenen Hefetransformationen.

Keine der isolierten Helices sowie deren Kombinationen konnten eine Interaktion mit der JmjC-Domäne wieder herstellen und die Reportergene aktivieren. Die Helices stellten demnach keine Interaktionsfläche zur Verfügung. Überraschender Weise führte nur das Konstrukt, welches keine Helix enthielt, zu einer Interaktion und damit zum Wachstum der Hefen sowie zur Enzymaktivität der α -Galaktosidase, obwohl dieser Bereich in einigen der gefundenen cDNA-Sequenzen, beispielsweise M1#15 für Aktin 4 oder M2#70 für Aktin 13, nicht vorhanden war (Abbildung 47). Vermutlich ging Aktin nicht aufgrund funktioneller Eigenschaften eine Interaktion mit CbfA ein. Vielmehr war das Protein ab einer bestimmten Größe sehr hydrophob. Dadurch kann auch die Interaktion ohne eine definierte Struktur erklärt werden.

3.6.8 *In vitro* Co-Immunopräzipitationen möglicher Interaktionspartner

Um die Protein-Protein-Interaktionen von Aktin und weiterer im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundener Partner mit CbfA in einem weiteren Testsystem zu analysieren und zu verifizieren, sind radioaktive Co-Immunopräzipitationen unter Verwendung des *Matchmaker™ Co-IP Kit* (Clontech) durchgeführt worden. Für dieses Verfahren wurden das Protein, welches die JmjC-Domäne beinhaltete, und einige interagierende Proteine mit [³⁵S]-Methionin in einer zellfreien Transkription/Translations-Reaktion markiert. Da der T7-Promotor und die Epitop-tags in den jeweiligen Vektoren unterhalb der *GAL4*-Sequenz lagen, wurden die Proteine ohne die *GAL4*-Domänen transkribiert und translatiert. Das Ergebnis der *in vitro* Co-Immunopräzipitation war nur durch eine Interaktion des *Bait*-Proteins mit dem cDNA-Bank-Protein möglich, die mittels Autoradiographie detektiert werden konnten. Zu den hier ausgesuchten Interaktionspartnern zählten die Histon H3 Lysin 4 Methyltransferase Set1, das *actin related protein 3* Arp3 und Aktin. Letzteres wurde parallel zu den in 3.6 beschriebenen Arbeiten analysiert. Set1 ist gewählt worden, da es mit der JmjC-Domäne des Transkriptionsregulator CbfA aufgrund des gemeinsamen Vorkommens im Zellkern interagieren könnte. Die Tatsache, dass Arp3 im Zytoplasma als Untereinheit des Arp2/3-Komplexes an der Polymerisation von Aktinfilamenten beteiligt ist, würde dieses Protein als Interaktionspartner ausschließen (Pollard & Beltzner, 2002). Dennoch hätte dieses Protein für Interaktionen dienen können, da weitere Arp-Proteine identifiziert worden waren, die im Nukleus innerhalb von *chromatin-remodelling*-Komplexe agierten (Shen *et al.*, 2003; Mizuguchi *et al.*, 2004).

In Abbildung 49 ist erkennbar, dass alle markierten Proteine über einen spezifischen Epitop-tag präzipitiert werden konnten. Diese Banden dienten als Positivkontrollen und Größenvergleiche für die folgenden Co-IPs. Diese zeigten, dass Aktin 4¹⁶⁰⁻³³³ und Set1¹⁷⁷⁻³²⁸ durch die JmjC-Domäne präzipitiert wurden. Es wurden das JmjC-Protein und jeweils das Aktin 4¹⁶⁰⁻³³³ bzw. das Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Protein detektiert, wodurch eine Interaktion mit der JumoniC-Domäne *in vitro* in einem zellfreien Lysat nachgewiesen wurde. Ob eine Präzipitation des Arp3²²⁰⁻⁴¹⁸-Proteins durch die JmjC-Domäne erfolgte, ist in Abbildung 49 nicht eindeutig zu erkennen. Durch eine Optimierung dieses Versuches (Daten nicht gezeigt) konnte geklärt werden, dass in diesem Fall eine Interaktion im zellfreien Lysat nicht stattfand.

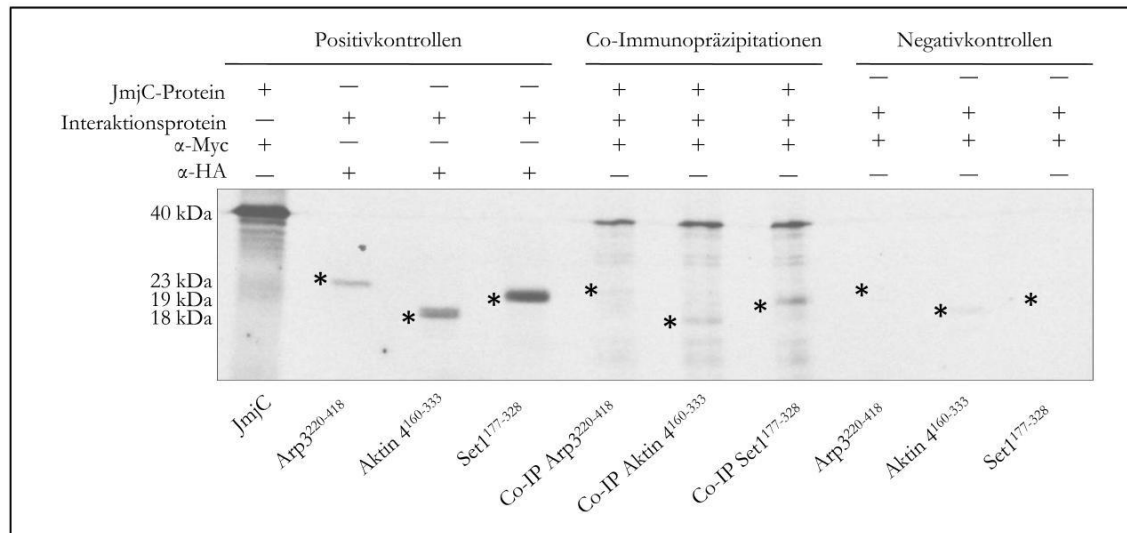


Abbildung 49: Co-Immunopräzipitationen der JmjC-Domäne mit verschiedenen Interaktionspartnern. Positivkontrollen: α -Myc präzipitierte das JmjC-Protein; α -HA präzipitierte Interaktionsproteine; für Co-IPs α -Myc verwendet; Negativkontrollen: α -Myc sollte keine Interaktionsproteine präzipitieren.

Während in den Negativkontrollen der Arp3²²⁰⁻⁴¹⁸ und Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Präzipitationen keine Banden zu erkennen sind, ist in der Spur des Aktinproteins eine schwache Bande zu sehen. Diese Bande deutete darauf hin, dass die vermeintliche Co-Immunopräzipitation nicht durch die JumonjiC-Domäne, sondern durch eine unspezifische Bindung des Aktinderivat an den c-Myc-Antikörper entstand oder es in dieser Präzipitation nicht vollständig durch die Waschschrte entfernt wurde. Mit Hilfe der *in vitro* Co-Immunopräzipitation konnte nur die Interaktion des Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Proteins mit der JumonjiC-Domäne von CbfA nachgewiesen werden. Diese Interaktion wurde nicht nur in dem Hefe-Zwei-Hybrid-System gezeigt, sondern konnte auch in Copräzipitationen mit *in vitro* translatierten Proteinen nachgewiesen werden.

3.6.9 Pull-down-Assay von CbfA durch das Set1-Derivat

Durch Untersuchungen von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-Zwei-Hybrid-System und durch radioaktive Co-Immunopräzipitationen konnte gezeigt werden, dass die Histon-Methyltransferase Set1 mit der JmjC-Domäne von CbfA interagiert. Diese Protein-Protein-Interaktion war in *S. cerevisiae* und in zellfreiem Lysat, jedoch nicht mit dem CbfA-Protein aus *D. discoideum*-Zellen gezeigt worden. Ein weiterer *in vitro*-Nachweis der Interaktion von Set1 mit CbfA könnte zusätzlich die Interaktion dieser beiden Proteine beweisen. Da die Pull-down-Versuche nicht radioaktiv durchgeführt wurden, war ein modifizierter Pull-down-Assay notwendig gewesen. Nicht das Bait-Protein, die JumonjiC-Domäne, wurde mit Hilfe eines Affinitäts-tags immobilisiert, sondern das Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Protein. Die im Hefe-Screening

identifizierte, codierende DNA konnte in den *D. discoideum*-Expressionsvektor pDV-NTAP-NYFP als *EcoRI/XhoI*-Fragment kloniert und als Fusionsprotein in AX2-Zellen überexprimiert werden (Meima *et al.*, 2007). Das resultierende Fusionsprotein besaß ein Molekulargewicht von 67 kDa. Nach der Inkubation des an IgG-Agarose immobilisierten NTAP-NYFP-Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Proteins mit Kernextrakt von AX2-Zellen, wurde der vermutete Protein-Protein-Komplex von der Matrix eluiert. Wurde CbfA durch das Set1-Derivat präzipitiert, sollte CbfA mittels SDS-PAGE und *Western-Blot* detektiert werden können (Abbildung 50).

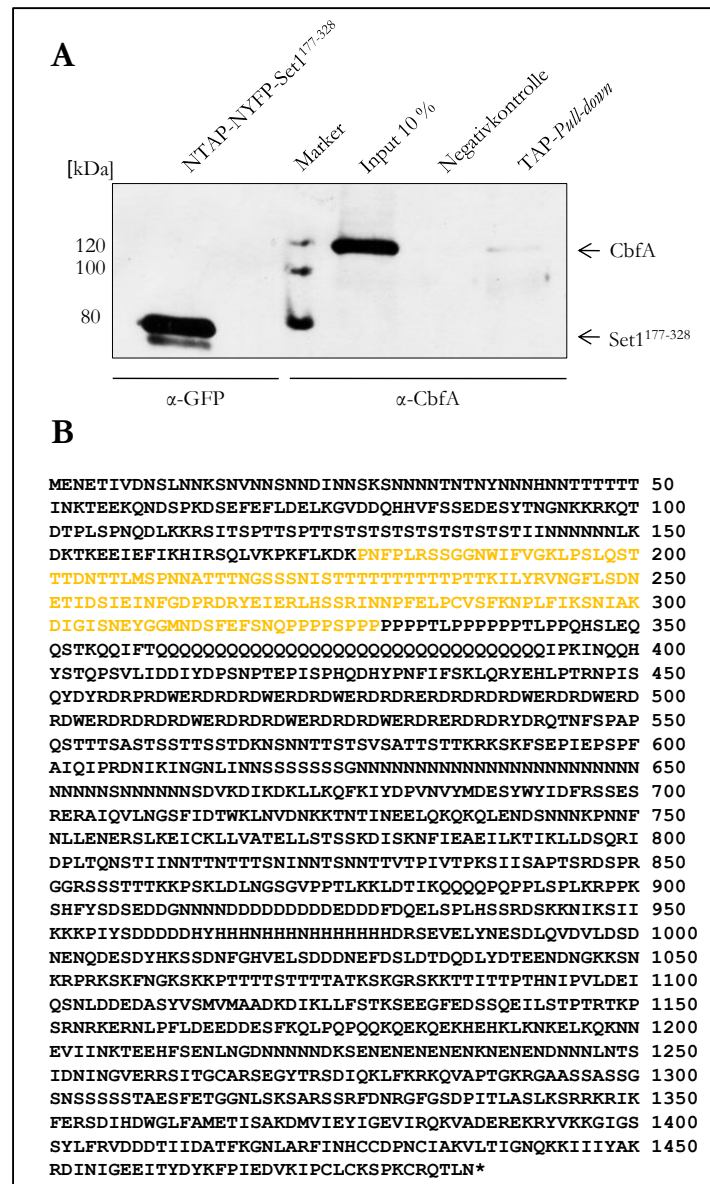


Abbildung 50: Resultat des *Pull-down*-Experimentes von NTAP-NYFP-Set1 (AS 177-328) mit Kernextrakt von AX2-Zellen. **A:** Das immobilisierte Protein NTAP-NYFP-Set1¹⁷⁷⁻³²⁸ ist mit einem GFP-Antikörper detektiert worden. Alle weiteren Proteine mit dem 7F3-Antikörper gegen CbfA; Input: 10 % des für die IP eingesetzten Kernextraktes; Negativkontrolle: kein immobilisiertes Set1-Protein im IP-Ansatz; TAP-Pull-down: präzipitiertes CbfA; **B:** Aminosäuresequenz von Set1 aus *D. discoideum*; Orange: identifiziertes Proteinderivat aus dem Hefe-Screening.

Ergebnisse

Die erste Spur des *Western-Blot* in Abbildung 50 zeigt, dass das 67 kDa schwere Fusionsprotein NTAP-NYFP-Set1¹⁷⁷⁻³²⁸ an eine IgG-Agarose immobilisiert werden konnte und der verwendete GFP-Antikörper in der Lage ist, auch das gelb fluoreszierende Protein (YFP) zu erkennen. Die drei weiteren Proteinspuren des *Western-Blots* präsentieren die Ergebnisse des *Pull-down-Assays*. In diesem Experiment konnte sehr wenig CbfA präzipitiert werden. Die schwache CbfA-Bande in der rechten Spur scheint weniger als 1 % des eingesetzten CbfA-Proteins darzustellen. Dennoch ist davon auszugehen, dass durch das Set1-Derivat eine Präzipitation von CbfA durch eine Protein-Protein-Interaktion stattgefunden hat, da in der Negativkontrolle keine Bande zu erkennen ist. Das im Hefe-Zwei-Hybrid-System gefundene Set1¹⁷⁷⁻³²⁸-Proteinderivat ist demzufolge in der Lage, das CbfA-Gesamtlängenprotein zu präzipitieren.

4 Diskussion

4.1 Genregulatorische Funktion von CbfA

Anhand von Untersuchungen an der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D wurden in vorangegangenen Arbeiten phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtypstamm AX2 von *Dictyostelium discoideum* beschrieben. Dabei sind durch den Mangel an CbfA veränderte Pino- und Phagozytoseraten sowie eine verlängerte Generationszeit des Organismus aufgetreten (Winckler *et al.*, 2001). In den Arbeiten von Winckler *et al.* (2004) und Lucas *et al.* (2009) wurde anhand von cDNA-Microarray-Experimenten und Entwicklungsstudien gezeigt, dass CbfA Einfluss auf die Genexpression in der vegetativen Wachstumsphase sowie der multizellulären Entwicklung von *D. discoideum* nimmt. Beispielsweise werden in vegetativen Zellen 162 Gentranskripte von CbfA positiv oder negativ reguliert (Lucas *et al.*, 2009).

Um einen *in vivo*-Nachweis für die Genregulation durch CbfA für ausgewählte Gene des cDNA-Microarrays zu erhalten, wurden Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) mittels mit einem TAP-tag versehenen CbfA-Derivats durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Promotorsequenzen der untersuchten Gene durch das CbfA-Derivat präzipitiert wurden (Kap. 3.3). Die zu den präzipitierten Promotoren zugehörigen Gene werden entweder durch die autonome Funktion der carboxy-terminalen Domäne (CTD) CbfAs reguliert oder von der CTD gebunden, jedoch nicht durch diese allein genregulatorisch beeinflusst (Lucas *et al.*, 2009). Auch eine CTD-unabhängige Genregulation durch den N-Terminus von CbfA ist vorstellbar, da Gentranskripte in ihrer Expression verändert wurden, für die in der Arbeit von Lucas *et al.* (2009) keine CTD-abhängige Regulation erkennbar war. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Promotorsequenzen in der CbfA-Chromatin-IP ebenfalls präzipitiert.

Die CbfA-vermittelte Genregulation durch DNA-Bindung könnte auf mehreren Wegen über die unterschiedlichen Funktionen der Proteindomänen des Transkriptionsregulators zustande kommen.

Die erste Möglichkeit wird durch die autonome Funktion der carboxy-terminalen Domäne dargestellt. Die CTD ist eine eigenständige, funktionelle Einheit, die in der Lage ist, relevante Gene des vegetativen Wachstums in ihrer Transkription zu beeinflussen. Beispielsweise wurde die Genexpression der Gene aus Cluster III und V allein durch die CTD positiv oder negativ reguliert (Lucas *et al.*, 2009). *In vivo* ist für die Ausführung der CTD-vermittelten genregulatorischen Funktion vermutlich das AT-Hakenmotiv ein

wesentlicher Faktor (Lucas *et al.*, 2009). Die Interaktion der CTD von CbfA mit der DNA wurde dabei durch ein Tripeptid (GRP) realisiert, dessen zentrale Aminosäure Arginin für die Interaktion auch *in vitro* essentiell war (Horn *et al.*, 1999).

Die AT-Haken-vermittelte Bindung von CbfA an die DNA könnte auch eine zweite Funktionsvariante von CbfA vermuten lassen. Neben der CTD werden auch N-terminal gelegene Proteindomänen in räumliche Nähe zur DNA gebracht. Möglich wäre eine kombinierte Erkennung von spezifischen DNA-Bereichen durch den AT-Haken der CTD und die Zinkfinger motive von CbfA. Zinkfingerstrukturen können ebenfalls als DNA-Bindemotive wirken (Krishna *et al.*, 2003). Es wäre vorstellbar, dass durch diese kombinierte Protein-DNA-Bindung eine größere Vielfalt von regulatorischen Strukturen gebunden werden könnte und die carboxy-terminale Domäne somit ein größeres Genrepertoire in der Genexpression beeinflussen kann.

Zinkfinger motive vermitteln nicht nur Protein-DNA-Bindungen, sondern konnten auch als Protein-bindende Domänen identifiziert werden (Brayer & Segal, 2008). Sie stellen daher ein neues Reservoir an funktionellen Möglichkeiten von Zinkfingerproteinen zur Verfügung. Protein-Protein-Interaktionen können neben den Zinkfinger motiven möglicherweise auch von der JmjC-Domäne eingegangen werden. Beispielsweise zeigten Arbeiten von Tronnorsjö *et al.* (2006), dass die JmjC-Domäne in Kombination mit der JmjN-Domäne des Proteins Gis1 aus *Saccharomyces cerevisiae* als Interaktionsfläche für Protein-Protein-Interaktionen diene. Ein Interaktionspartner für CbfA-CTD konnte trotz intensiver Screenings im Hefe-Zwei-Hybrid-System bisher nicht identifiziert werden (Lucas, 2009).

Eine dritte Möglichkeit, wie CbfA über DNA-Bindung Gene regulieren könnte, besteht somit durch eine parallele Interaktion des Proteins mit der DNA und mit weiteren Faktoren. In diesem Zusammenhang sollen die untersuchten Gene aus Cluster II und IV genannt werden, die von der CTD gebunden werden, jedoch keine Veränderungen in der Genregulation durch die CTD erkennen ließen (Lucas *et al.*, 2009). Möglich wäre hier, dass eine Erkennung der regulatorischen Sequenz über den AT-Haken der CTD erfolgte, jedoch Protein-Protein-Interaktionen der Zinkfinger oder der JmjC-Domäne mit unbekannten Faktoren zur Genregulation notwendig waren.

Eine vierte funktionelle Variante über DNA-Bindung von CbfA könnte durch den N-Terminus unabhängig von der carboxy-terminalen Domäne ausgeführt werden. Vorstellbar wäre eine Bindung der DNA durch die Zinkfingerstrukturen ohne Beteiligung des AT-Hakens. Für Gene aus Cluster I und VI wurden Genregulationen identifiziert, die ohne DNA-Bindung der CTD von CbfA ausgeübt wurden. Auch hier wäre die Vermittlung der

Genregulation durch Protein-Protein-Interaktionen der Zinkfinger motive oder der JmjC-Domäne mit einem weiteren Faktor während der Bindung von CbfA an die DNA denkbar. Die JmjC-Domäne von CbfA lässt außerdem eine post-translationale Funktion von CbfA vermuten. JmjC-Proteine wurden in vielen Veröffentlichungen als Demethylasen von Histon-Seitenketten identifiziert (Tsukada *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2006; Whetstone *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2006a; Chang *et al.*, 2007). Eine Genregulation über epigenetische Modifikationen der Histone ist daher durch die vermutete enzymatische Reaktion der JmjC-Domäne ebenfalls nach DNA-Bindung vorstellbar und wird in dieser Arbeit in nachfolgenden Kapiteln detaillierter diskutiert.

Das Gen *acaA* codiert für die Adenylzyklase A, ein Protein der multizellulären Entwicklung, dass den essentiellen Botenstoff cAMP produziert. Der Entwicklungsphänotyp von JH.D, der aufgrund des Ausbleibens der cAMP-vermittelten Signalkaskade keine Fruchtkörper ausbildet, ist u. a. auf die fehlende Regulation des *acaA*-Genes zurückzuführen (Siol *et al.*, 2006a). Dass CbfA ebenfalls den Promotor des *acaA*-Gens in der multizellulären Entwicklung *in vitro* bindet und durch die vermutete Genregulation von *acaA* an der Induktion der Entwicklungsphase beteiligt ist, wurde in der Arbeit von Siol *et al.* (2006a) gezeigt. In weiteren Untersuchungen konnte die *in vitro*-Bindung auf die carboxy-terminale Domäne CbfAs eingeschränkt werden. Jedoch reichte die isolierte CTD zur Aktivierung der *acaA*-Transkription nicht aus (Lucas *et al.*, 2009).

Anhand von vergleichenden CbfA-Chromatin-IPs mit vegetativen und sich entwickelnden Zellen wurde die Protein-DNA-Bindung durch das Volllängenprotein während der multizellulären Entwicklung in der vorliegenden Arbeit *in vivo* nachgewiesen (Kap. 3.4). Dieser Nachweis untermauert die vermutete Genregulation von *acaA* durch CbfA. Für die Aktivierung der Transkription von *acaA* sind vermutlich die Funktionen mehrerer Domänen von CbfA oder Protein-Protein-Interaktionen mit unbekannten Faktoren notwendig.

4.2 Der Verlust einer funktionellen Domäne von CbfA führt zu einem Entwicklungsdefekt

In der vorliegenden Arbeit wurde der *in vivo*-Nachweis erbracht, dass CbfA die Promotorsequenz des entwicklungsrelevanten Genes *acaA* während der multizellulären Entwicklung bindet und vermutlich für dieses Gen als Transkriptionsaktivator dient. In früheren Arbeiten konnte diese DNA-Bindung auf die carboxy-terminale Domäne von CbfA eingegrenzt werden. Jedoch wurde diese Interaktion nur *in vitro* gezeigt (Lucas, 2009). Hinzu kam, dass die Transkription dieses entwicklungsrelevanten Gens durch die CTD

allein nicht aktiviert wurde und der Aggregationsdefekt in JH.D-Zellen durch die ektopisch exprimierte CTD nicht geheilt wurde (Lucas *et al.*, 2009). Es schienen weitere funktionelle Domänen, wie beispielsweise die Zinkfinger motive, für eine Transkriptionsaktivierung oder die JumonjiC-Domäne von CbfA im Zusammenhang mit einer vermuteten epigenetischen Genregulation über Demethylierung von Histon-Seitenketten, an der Aktivierung des *acaA*-Gens beteiligt zu sein. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden Deletionen bzw. Punktmutationen der entsprechenden Proteindomänen erstellt und im Hinblick auf die Entwicklungsphase untersucht (Kap. 3.5).

Es wurde gezeigt, dass nach Expression eines CbfA, in dem beide Zinkfinger motive deletiert wurden, der Entwicklungsdefekt von JH.D(*ura*)-Zellen nicht aufgehoben wurde. Insbesondere die funktionelle Inaktivierung des ersten Zinkfinger motifs durch eine Punktmutation (H414L) führte zu einem inaktiven CbfA-Protein, das den Entwicklungsphänotyp der CbfA-Mutante nicht heilen konnte.

Ektopisch exprimierter CbfA, dessen zweites Zinkfinger motiv deletiert war, hingegen heilte den Entwicklungsdefekt der Suppressionsmutante. Diese Zellen durchliefen vollständig die Stadien der multizellulären Entwicklung, was in der Ausbildung eines Fruchtkörpers resultierte.

Es kann vermutet werden, dass für die Aktivierung entwicklungsrelevanter Gene, beispielsweise von *acaA*, die Funktion des ersten Zinkfingers, jedoch nicht die des zweiten Zinkfingers, von CbfA wesentlich ist. Auf welche Weise das erste Zinkfinger motiv in einer Aktivierung dieser Gene involviert ist, kann bisher nur spekuliert werden. Vorstellbar wäre, dass durch eine kombinatorische Bindung von Promotorsequenzen durch die CTD und dem ersten Zinkfinger motiv gemeinsam eine genregulatorische Funktion CbfAs ausgeübt werden kann. Auch eine Interaktion des Zinkfinger motifs mit einem weiteren Faktor wäre denkbar.

Um der Vermutung nachzugehen, ob die JmjC-Domäne von CbfA für die Induktion der Entwicklungsphase als putativer Chromatin-„Remodeller“ relevant ist, wurde diese Proteindomäne inaktiviert. Durch zwei Punktmutationen in der Gensequenz von CbfA wurde eine veränderte Aminosäuresequenz (H163A und D165A) der JmjC-Domäne im Bereich der Fe²⁺-Bindestelle eingeführt. Aufgrund von Sequenzvergleichen der CbfA-JmjC mit anderen JmjC-Domänen wurde angenommen, dass die für die katalytische Funktion notwendige Bindung des Cofaktors Eisen nicht stattfand und somit eine Histon-Demethylase-Aktivität ausblieb (Trewick *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dieser vermutete, katalytische Funktionsverlust der JmjC-Domäne dennoch zu einem funktionellen Protein führte, das in

der Lage war, den Entwicklungsphänotyp der Zellen zu heilen. Die Zellen wiesen einen vollständigen Entwicklungszyklus bis hin zur Bildung eines Fruchtkörpers auf. Es scheint, dass die Funktion der JmjC-Domäne von CbfA nicht für eine Induktion von Entwicklungsgenen essentiell ist. Entwicklungsrelevante Gene werden möglicherweise unabhängig der vermuteten Demethylasefunktion aktiviert. Eine durch die JmjC-Domäne von CbfA bestimmte, epigenetische Regulation im Sinne einer post-translationalen Modifikation von Histonen von entwicklungsrelevanten Genen ist aufgrund dieser Beobachtungen fraglich.

4.3 Erste Erkenntnisse zur Funktion der JumonjiC-Domäne von CbfA

Proteine, die JumonjiC-Domänen besitzen, wurden in vielen Veröffentlichungen als Histon-Demethylasen identifiziert (Tsukada *et al.*, 2006; Yamane *et al.*, 2006; Whetstine *et al.*, 2006; Klose *et al.*, 2006a; Cloos *et al.*, 2006; Fodor *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2007). Sie katalysieren unter Bindung von Fe^{2+} und mithilfe von 2-Oxoglutarat eine oxidative Demethylierung an Lysin- oder Argininresten der Histone H3 oder H4. Diese post-translationalen Modifikation in Form einer Demethylierung von Histon-Seitenketten ist eine epigenetische Genregulation, die beispielsweise zur Aktivierung oder Reprimierung der Transkription von Genen führt (Delcuve *et al.*, 2009).

Um erste Erkenntnisse zur Funktion der JmjC-Domäne von CbfA zu erhalten, wurden Immunofluoreszenzfärbungen für verschiedene Histon-Lysin-Markierungen in den Stämmen AX2 und JH.D vergleichend durchgeführt (Kap. 3.6.1). Die Modifikation des Lysins an Position 4 von Histon H3 ist eine charakteristische Methylierung des Euchromatins. Diese Lysinmodifikation wird von Faktoren erkannt, wodurch erst eine Transkription aktiviert werden kann (Wysocka *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006). Während aktivierte Promotorsequenzen häufig Trimethylierungen am Lysin 4 von Histon H3 besitzen, sind auch Dimethylierungen des Lysins 4 von Histon H3 jedoch eher in codierenden Sequenzbereichen zu finden (Bernstein *et al.*, 2002, 2005). In dem haploiden Genom von *D. discoideum* liegen codierende Sequenzen sehr dicht hintereinander. Oft trennen weniger als 1000 bp die Gene voneinander, wobei in den Zwischengensequenzen regulatorische Bereiche, wie Promotoren und Terminatoren, zu finden sind (Eichinger *et al.*, 2005). Dementsprechend stellt fast das gesamte Genom Euchromatin dar und vermutlich sind viele Histone mit einer H3K4-Tri- und Dimethylierung markiert (Abbildung 27).

Hingegen kennzeichnet eine Modifikation des Lysins an Position 9 von Histon H3 Heterochromatin. Diese Methylierung trägt zur Kondensation des Chromatins bei. Eine Transkription von Genen ist nicht möglich. Heterochromatin ist in *D. discoideum* besonders an den Chromosomenenden vorhanden. Auch centromere Strukturen, die vorrangig von repetitiven Sequenzen gebildet werden (Eichinger *et al.*, 2005), sind heterochromatisch. Die Verteilung von Heterochromatin in *D. discoideum* ist auf wenige Bereiche beschränkt und wurde durch die Fluoreszenzfärbung nur in Form von punktuellen Bereichen markiert (Abbildung 27).

Bei einem Vergleich des Wildtypstammes AX2 mit der *cbfA*-Suppressionsmutante JH.D konnte für die analysierten Histon-Lysin-Markierungen keine Veränderung in der Signalstärke erkannt werden. Anhand dieses Experiments war für CbfA keine Histon-Demethylasefunktion für Di- oder Trimethylierungen weder von H3K4me noch für H3K9me nachzuweisen. In diesem Zusammenhang soll auf Veröffentlichungen hingewiesen werden, in denen zur Klärung der Funktion von JmjC-Proteinen für derartige Immunofluoreszenz-Darstellungen meist eine Überexpression des jeweilig analysierten JmjC-Proteins durchgeführt wurde (Hong *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Dadurch war ein Demethylierungseffekt erst ersichtlich. Eine Überexpression des CbfA-Proteins führt jedoch zum Absterben der Zellen (nicht publizierte Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe), wodurch diese Möglichkeit nicht verwendet werden konnte.

Da anhand von Immunofluoreszenzfärbungen kein Hinweis auf eine demethylierende Funktion von CbfA gegeben wurde, sind Analysen hinsichtlich einer Erkennung von Histon-Modifikationen durchgeführt worden. In Peptid-Pull-down-Assays wurde gezeigt, dass CbfA durch die Trimethylierung am Lysin 9 von Histon H3 präzipitiert wurde (Kapitel 3.6.2). CbfA erfasst diese Methylierung, wobei nicht bekannt ist, wie diese Erkennung vermittelt wird. Eine Möglichkeit bieten die Zinkfinger motive. Der erste Zinkfinger von CbfA ist vermutlich in einer CbfA-abhängigen Aktivierung von Promotoren entwicklungsrelevanter Gene involviert. Dieses DNA-Bindemotiv ist essentiell für die CbfA-abhängige Genregulation in der Entwicklungsphase und der damit verbundenen Induktion dieser in *D. discoideum* (Kapitel 3.5). Der zweite Zinkfinger, vermutlich von einem PHD-ähnlichen Typ, scheint dafür keine Rolle zu spielen, da in der Suppressionsmutante, die ektopisch die CbfA-Mutante exprimiert, kein Entwicklungsdefekt mehr zu beobachten war. Es besteht die Vermutung, dass dieses zweite ZF-Motiv für die Erkennung von Histon-Modifikationen zuständig ist. Einige Proteine der JmjC-Familie besitzen ebenfalls PHD-Finger motive. Häufig konnte für diese Proteine eine H3K4me3-Demethylaseaktivität festgestellt werden. Daher wird vermutet, dass

PHD-Finger für eine spezifische Erkennung von Trimethylierungen des Lysins an Position 4 verantwortlich sind (Li *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Wysocka *et al.*, 2006). Andererseits bindet das humane SMCX/JARID1C mittels des N-terminalen PHD-Fingers eine H3K9-Trimethylierung (Iwase *et al.*, 2007). Auch das JmjC-Protein Lid2 aus *Schizosaccharomyces pombe* erkennt eine H3K9-Trimethylierung vermutlich mittels eines PHD-Fingers. Durch eine Deletion der zweiten PHD-Domäne von Lid2 konnte in einem Peptid-Pull-down-Assay diese Histonmarkierung nicht mehr vom Protein gebunden werden (Li *et al.*, 2008). Der zweite Zinkfinger von CbfA, der nicht für die CbfA-abhängige Genexpression des entwicklungsrelevanten Gens *aca4* wesentlich ist, könnte eventuell die Histon-Modifikation des Lysins an Position 9 ähnlich des PHD-Fingers von Lid2 erkennen. Obwohl viele Untersuchungen hinsichtlich der Erkennungen von Histon-Modifikationen über Bindemotive und Chromatin-assoziierte Proteine durchgeführt wurden, sind diese Erkennungsmechanismen dennoch nicht vollständig verstanden (Mellor, 2006).

CbfA stellt einen relevanten Genregulator für vegetativ wachsende Zellen dar (Lucas *et al.*, 2009). Durch Histon-ChIP-Analysen im Stamm AX2 und JH.D wurde untersucht, welchen Methylierungsstatus einzelne, der regulierten Gene im Wildtyp aufwiesen und ob in der *cbfA*-Suppressionsmutante eine Veränderung hinsichtlich der Methylierung erfolgte (Kapitel 3.6.3). Die untersuchten Gene wurden nach ihrer Funktion und anhand ihrer biologischen Prozesse gruppiert (Lucas *et al.*, 2009). Dabei wurde anschließend jedes Gen aufgrund dessen Reaktion auf die C-terminale Domäne in der JH.D-Umgebung in einem von sechs Clustern einsortiert. Die Cluster stellen daher sechs verschiedene Modi der CbfA-Genregulation in Verbindung mit der Expression von GFP-CTD dar. Die Expression der Modellgene der Cluster I, II und III wurde durch CbfA positiv beeinflusst. Die Cluster-III-Gene wurden dabei allein von der CTD reguliert. Gene der Cluster IV, V und VI hingegen wurden in ihrer Expression durch CbfA reprimiert. Auch hier zeigte die CTD allein eine Reprimierung für Cluster-V-Gene. Es wurde vermutet, dass Gene der Cluster II und IV durch eine Kombination von funktionellen Domänen CbfAs und das Gene der Cluster I und VI unabhängig der CTD reguliert werden (Lucas *et al.*, 2009). In diesem Zusammenhang könnte für die Genregulation der Gene von Cluster I, II, IV und VI die vermutete Demethylasefunktion der JmjC-Domäne CbfAs eine wesentliche Rolle spielen.

Der Mangel an CbfA im Stamm JH.D führte jedoch zu keiner Veränderung hinsichtlich der Methylierungen von Histon-Seitenketten im Vergleich zu AX2. Die analysierten promotornahen Sequenzbereiche waren in AX2- sowie in JH.D-Zellen am Lysin 4 des Histons H3 dreifach methyliert, wodurch eine Expression der Gene in beiden Stämmen

möglich wäre. Dies lässt vermuten, dass die Regulation der Genexpression während des vegetativen Wachstums nicht auf eine JmjC-Domäne-vermittelte Demethylierungsreaktion und damit auf eine epigenetische Genkontrolle durch CbfA zurückzuführen ist. Die Aktivierung bzw. Reprimierung der CTD-unabhängig regulierten Gene scheint eher von der Funktion der Zinkfinger motive als zusätzliche DNA-Bindestrukturen oder aufgrund von Protein-Protein-Interaktionen mit noch unbekannten Faktoren hinzudeuten, wobei eine derartige Interaktion auch von der JmjC-Domäne eingegangen werden könnte.

4.4 Herstellung der CbfA-JumonjiC-Domäne für Strukturanalysen

Für weitere Funktionalitätstests, beispielsweise durch *in vitro* Histone-Demethylase-Assays, und für die Strukturaufklärung der JmjC-Domäne von CbfA wurde versucht, die JumonjiC-Proteindomäne heterolog zu exprimieren. Dafür wurden JmjC-Konstrukte hergestellt, die mit einem 6 x Histidin-tag bzw. mit dem Maltose-Bindeprotein fusioniert waren. Die heterologe Expression fand in bakteriellen Expressionssystemen statt (Kap. 3.6.4).

Trotz umfangreicher Optimierungsversuche ist es nicht gelungen, eine ausreichende Menge an nativem Protein für einen *in vitro*-Assay und für eine röntgenkristallographische Strukturaufklärung zu erhalten. Die Proteindomäne aggregierte nach Induktion der Expression in unterschiedlichen Bakterienstämmen und bei verschiedenen Expressionsbedingungen unter Bildung von hydrophoben Faltungsintermediaten. Eine Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen und anschließender Rückfaltung der JmjC-Domäne führte zwar zum erwünschten Ergebnis (Kap. 3.6.5), beim Aufkonzentrieren der gereinigten und renaturierten JmjC-Domäne jedoch aggregierte diese abermals zu Oligomeren.

In einigen publizierten Arbeiten wurden bereits die Tertiärstrukturen verschiedener JmjC-Proteine gelöst und dargestellt (Chen *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 2007). In den aufgeführten Veröffentlichungen wurde das charakteristische *Jelly-Roll*-Motiv der JmjC-Domäne erkannt. Die Proteinexpression erfolgte dabei in bakteriellen Expressionssystemen, wobei hier genügend lösliches Protein zur Kristallisation erhalten wurde. Die in diesen Publikationen verwendeten Bakterienstämme und Kultivierungsbedingungen wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls angewandt, führten jedoch nicht zur Expression der löslichen JmjC-Domäne von CbfA.

Weitere Versuche, die JmjC-Domäne von CbfA heterolog in bakteriellen Systemen als lösliches Proteinderivat zu exprimieren, könnten durch die Verwendung zusätzlicher CbfA-Konstrukte erfolgen. Hydrophobe Proteinbereiche, die im Volllängenprotein innerhalb der

Proteinstruktur liegen, könnten bei der Expression einzelner Proteindomänen zur Aggregatbildung führen, da diese aufgrund ihrer Lage an der Proteinoberfläche nun mit anderen Proteinen in Kontakt treten können. Eventuelle hydrophobe Proteinbereiche, gekennzeichnet durch Prolin-reiche Sequenzen am C-Terminus des exprimierten CbfA-Konstrukts, könnten Ursache der Aggregatbildung sein. Die Expression eines CbfA-Konstruktes, das diese Prolin-reichen Sequenz nicht enthält, würde eventuell keine Proteinaggregation nach sich ziehen.

Eine andere Möglichkeit, die JmjC-Domäne als Monomer zu exprimieren, wäre ein Wechsel des Expressionssystems. Beispielsweise könnten Expressionsversuche in Hefe oder mit Hilfe des Baculovirus-Systems in Insektenzellen stattfinden. Im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit konnten die genannten Systeme jedoch nicht mehr verwendet werden.

4.5 Suche nach Interaktionspartnern der JumonjiC-Domäne

Die JumonjiC-Domäne ist eine hochkonservierte Proteindomäne, die in vielen eukaryotischen Transkriptionsfaktoren zu finden ist. Aufgrund der JmjC-Domäne können diese Faktoren Einfluss auf die Chromatindynamik nehmen und somit die Transkription von Genen regulieren. Interessanterweise agieren JmjC-Proteine für die Transkriptionsregulation auch innerhalb von Proteinkomplexen, wobei Protein-Protein-Interaktionen mit weiteren Regulationsfaktoren eingegangen werden. Beispielsweise interagiert das JmjC-Protein Lid2 aus *S. pombe* mit dem Clr8-Rik1-Komplex (Li *et al.*, 2008). Innerhalb dieses Komplexes ist Lid2 für die H3K4me3-Demethylierung von Histon-Seitenketten verantwortlich. Durch die Protein-Protein-Interaktion von Lid2 mit dem Clr8-Rik1-Komplex entsteht eine Grenzfläche, an der ein weiteres Protein, Clr4, an den Komplex rekrutiert werden kann und eine H3K9-Methylierung vermittelt. Diese Kreuzreaktion von Demethylierung am Lysin 4 und Methylierung an Lysin 9 von Histon H3 wurde durch die Interaktion eines JmjC-Proteins mit weiteren Faktoren realisiert und führte zu einer Heterochromatisierung. Ob CbfA ebenfalls über die JmjC-Domäne Protein-Protein-Interaktionen eingeht, wurde anhand eines Screenings von Interaktionspartnern mit der JmjC-Domäne im Hefe-Zwei-Hybrid-System analysiert (Kap. 3.6.6).

Vorteile dieses Systems sind das Screening von möglichst vielen Interaktionspartnern aufgrund der kostengünstigen Kultivierung und Handhabung des Modellorganismus und der Erhaltung von post-translationalen Modifikationen der Proteine. Nachteile entstehen

Diskussion

jedoch durch eine eventuell veränderte Faltung der nicht artspezifischen Proteine, wodurch sogenannte falsch positive oder falsch negative Interaktionspartner identifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Interaktionsscreenings mit der JmjC-Domäne von CbfA durchgeführt. Es wurden dafür zwei unterschiedlich hergestellte cDNA-Banken von vegetativ wachsenden *D. discoideum*-Zellen verwendet (Lucas, 2009). In beiden Screenings sind mehr als 2×10^6 Zygoten auf Protein-Protein-Interaktionen untersucht worden. Dabei konnten 34 mögliche Interaktionspartner der JmjC-Domäne nach den Kriterien des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems identifiziert werden. Das in dem zweiten Screening identifizierte Proteinderivat der Histon-Methyltransferase Set1 ist wie CbfA ein epigenetischer Regulator und war von besonderem Interesse. Weitere Proteine, wie Aktin und das im Arp2/3-Komplex involvierte Protein Arp3 schienen ebenfalls als Interaktionspartner interessant. Für Aktin, dass eher als Komponente des Zytoskelett bekannt ist und eine wesentliche Rolle im Cytoplasma einnimmt, wurden seit kurzem auch Funktionen im Zellkern, wie beispielsweise bei der Transkription, der mRNA-Prozessierung und dem Chromatin-remodelling, gefunden (Bettinger *et al.*, 2004). Weiterführende Untersuchen in Form von Co-Immunopräzipitationen zeigten jedoch, das Aktin sowie Arp3 in zellfreien Lysat nicht mit der JmjC-Domäne interagierten und somit als falsch positive Interaktionspartner einzuordnen waren. Das im Hefe-Screening identifizierte Proteinderivat von Set1 wurde auch in einer Co-IP durch die JmjC-Domäne präzipitiert (Kap. 3.6.8). Ein weiterer Versuch, mit Hilfe eines am Set1-Proteinderivat fusionierten TAP-tags zeigte eine Fällung des CbfA-Proteins in Kernextrakten von *Dictyostelium discoideum* (Kap. 3.6.9). Die in dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien lassen somit die Vermutung aufkommen, dass eine Protein-Protein-Interaktion zwischen der Histon-Methyltransferase Set1 und CbfA stattfindet. Der interagierende Bereich des Set1-Proteins von *D. discoideum*, der mit der JmjC-Domäne CbfAs eine Interaktion eingeht, wurde in der folgenden Abbildung dargestellt.

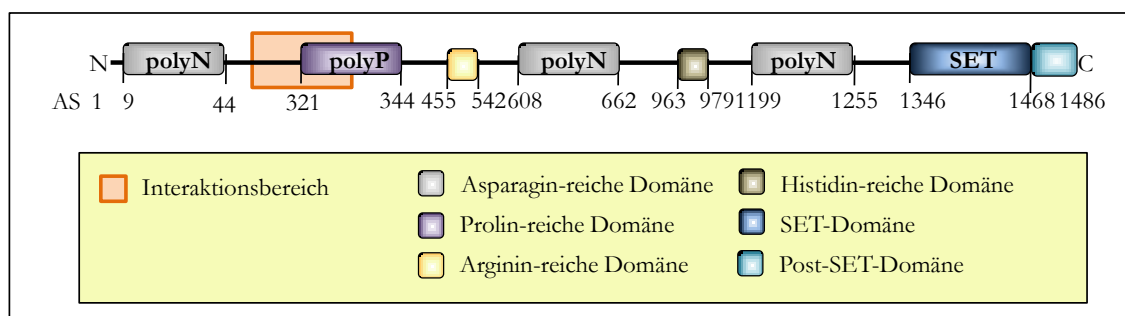


Abbildung 51: Proteinschema der Histon-Methyltransferase Set1 von *D. discoideum*.

Auffallend für den identifizierten Interaktionsbereich von Set1 ist ein Teil einer Prolinreichen Domäne, die als Interaktionsfläche dienen kann (Phizicky & Fields, 1995). Eine Protein-Protein-Interaktion zwischen CbfA, dem H3K9me3-Modifikation erkennenden Protein, und Set1, der H3K4-Methyltransferase, lässt eine Kreuzreaktion von Histon-Methylierung und -Demethylierung vermuten. Für das JmjC-Protein Lid2 beispielsweise wurden neben der beschriebenen Heterochromatisierung ebenso angenommen, dass es anhand der Erkennung einer H3K9-Trimethylierung über einen PHD-Finger auch Set1 und Lsd1 zur Modifikation am Histon H3 rekrutierte. Dadurch erfolgte gleichzeitig eine Methylierung durch Set1 am Lysin 4 und eine Demethylierung durch Lsd1 am Lysin 9 von Histon H3 an aktiv transkribierten Genen. Das JmjC-Protein Lid2 war vermutlich auch an einer Euchromatisierung und an der Aktivierung der Genexpression involviert (Li *et al.*, 2008). Welche Funktion CbfA durch die Protein-Protein-Interaktion mit Set1 an Histonen in *D. discoideum* ausübt und ob eine Kreuzreaktion durch die putative Demethylasefunktion und das interagierende Set1-Protein stattfindet, kann bisher nur spekuliert werden.

4.6 CbfA beeinflusst die Expression mehrerer Retrotransposons

Der C-Modul-bindende Faktor A ist an der Regulation des Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A beteiligt. Da die C-terminale Domäne des Proteins *in vitro* über ein AT-Haken-Motiv das C-Modul des Retrotransposons in einer homopolymeren AT-reichen Sequenz bindet (Siol *et al.*, 2006b, Lucas *et al.*, 2009), wurde anfangs vermutet, dass CbfA direkt die Minus-Strang-Transkription aktiviert. Jedoch führte diese Bindung von CbfA an das C-Modul nicht zur transkriptionellen Aktivierung des modulinternen Promotors und damit zur Synthese der Minus-Strang-RNA. In der Arbeit von Bilzer *et al.* (2010) wurde in einem Luciferase-Reporter-Assay gezeigt, dass in Abhängigkeit von CbfA keine Transkriptionsaktivierung durch das C-Modul von TRE5-A stattfand. Im A-Modul des Retrotransposons wird ebenfalls eine Promotorsequenz vermutet (Schumann *et al.*, 1994). Auch hier wurde keine CbfA-abhängige Transkriptionsaktivierung durch die Promotorsequenz des A-Moduls von TRE5-A beobachtet (Bilzer *et al.*, 2010). In *Northern-Blot*-Analysen wurde jedoch gezeigt, dass CbfA die Transkription von TRE5-A in Sense- und in Antisense-Richtung reguliert. Die Expressionsregulation wird dabei allein durch die Funktion der C-terminalen Domäne vermittelt (Beck, 2002; Bilzer *et al.*, 2010). Da CbfA über 160 Gentranskripte in ihrer Expression reguliert (Lucas *et al.*, 2009), besteht die Vermutung, dass CbfA die Transkription eines oder mehrerer Faktoren beeinflusst, die für die Aktivierung der Plus- und der Minus-Strang-Transkription von TRE5-A verantwortlich sind.

Dass CbfA die Transkription des Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A.1 beeinflusst, konnte in der vorliegenden Arbeit anhand quantitativer Messungen der TRE5-A-Transkriptmengen in der CbfA-Mutante bestätigt werden (Kap. 3.2). Auch die autonome Funktion der C-terminale Domäne von CbfA in der TRE5-A.1-Regulation wird durch die quantitative Untersuchung bekräftigt. CbfA ist somit ein Wirtsprotein, das in der Lage ist, die Menge an Sense- und Antisense-Transkripten von TRE5-A positiv zu regulieren. Integrationen von transposablen Elementen in Gene des Wirtes können Mutationen hervorrufen. Es ist deshalb zu erwarten, dass Zellen das Ausbreiten von Retrotransposons durch Mechanismen wie beispielsweise *post-transcriptional gene-silencing* (PTGS) verhindert. In *Dictyostelium* kann bei diesem Prozess durch die Antisense-RNA-Transkription RNA (dsRNA) mit Hilfe von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen gebildet werden (Martens *et al.*, 2002). Diese dsRNA wird zu kleinen RNA-Molekülen prozessiert, die an einem Abbau der Transkripte von Retrotransposons involviert sind. Im folgenden Kapitel 4.7 wird näher auf den Mechanismus in Verbindung mit der RNA-Interferenz eingegangen. Da CbfA die Plus- und Minus-Strang-Transkription von TRE5-A reguliert, könnte dieses Protein an dem PTGS-Mechanismus und somit am *Silencing* dieser Retrotransposons beteiligt sein.

CbfA scheint darüberhinaus auch andere transposable Elemente in ihrer Transkription zu beeinflussen. Die Transkriptmenge des Elementes TRE5-B, welches ein A-Modul in der 5'-UTR jedoch kein C-Modul in der 3'-UTR enthält (Glöckner *et al.*, 2002), wird ebenfalls in Abhängigkeit von CbfA positiv reguliert. Vermutlich aktivierte CbfA ähnlich zu TRE5-A die Plus-Strang-Transkription über die Regulation eines weiteren Faktors, wodurch über den PTGS-Mechanismus ein *Silencing* des Retrotransposons erfolgt. Im Gegensatz zur TRE5-A-Regulation wurde die Aktivierung der TRE5-B-Transkription durch die Komplementation in JH.D mit dem rekombinanten CbfA nicht bestätigt. Auch zeigte das CbfA-Derivat GFP-CTD keine Erhöhung der TRE5-B-Transkriptmenge in der Suppressionsmutante.

Für ein weiteres Non-LTR-Retrotransposon konnte eine Transkriptionsregulation durch CbfA nachgewiesen werden. Das der TRE3-Familie angehörige Retrotransposon TRE3-C wurde in der CbfA-Mutante überexprimiert. Über dieses Retroelement ist bisher nur wenig bekannt. Es gilt jedoch als gesichert, dass dieses Element im Gegensatz zu TRE5-Elementen ausschließlich unterhalb von tRNA-Genen integriert (Winckler *et al.*, 2002). Wie CbfA die Transkription von TRE3-C inhibiert, ist bisher unbekannt. Auch für dieses Retroelement wurde durch die Komplementation mit rCbfA in JH.D-Zellen die Expression nicht wieder hergestellt.

Da für TRE5-B und TRE3-C eine Komplementation der Funktion von CbfA mit dem CbfA-Derivat rCbFA, das fast vollständig dem Wildtyp-CbfA entspricht, in der CbfA-Mutante festzustellen war, ist in diesen Fällen von einem Artefakt-Ergebnis auszugehen. Die Transkriptmengen dieser Retroelemente werden vermutlich nicht durch CbfA beeinflusst.

Neben dem genannten Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A wird auch Skipper als einziges der untersuchten LTR-Retroelemente durch CbfA in seiner Expression reguliert. Hier wurde eine positive Regulation der Skipper-Expression gefunden, die auch durch das CbfA-Derivat rCbFA im Stamm JH.D wiederhergestellt wurde. Die C-terminale Domäne konnte die CbfA-vermittelte Expression dieses Retrotransposons nicht komplementieren. Wie CbfA die Transkriptmenge dieses Retrotransposons erhöht und ob Skipper über den PTGS-Mechanismus einem *Silencing* unterliegt, ist bisher nicht bekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass CbfA die Transkriptionsregulation von Skipper auf einen anderen Weg als bei TRE5-A vermittelt, da für Skipper im Gegensatz zu TRE5-A die Funktion der CTD allein zur Regulation nicht ausreichend war. Vermutlich konnte nur mit Hilfe weiterer Proteindomänen CbfAs, beispielsweise der Zinkfinger motive in Kombination mit der CTD, eine Regulation der Skipper-Transkriptmengen stattfinden.

In diesem Zusammenhang soll die vermutete demethylierende Funktion der JmjC-Domäne von Histon-Seitenketten in Verbindung mit der TRE5-A-Retrotransposition diskutiert werden. In der Arbeit von Bilzer *et al.* (2010) wurde gezeigt, dass die ektopisch exprimierte CTD von CbfA in JH.D-Zellen die TRE5-A-Transkriptmenge erhöht, jedoch das Retrotransposons an seiner Integrationsstelle nicht integrieren kann. Es wurde daher vermutet, dass insbesondere durch die Funktion der JmjC-Domäne als putative Histon-Demethylase CbfA einen wesentlichen Beitrag zur Integration von Retrotransposons während der Retrotransposition leistet.

Folgende Hypothese könnte im Falle einer Histon-Demethylase-Aktivität von CbfA durch die JmjC-Domäne aufgestellt werden. Heterochromatische Bereiche in *D. discoideum* sind nur im Centromerbereich und an den vermuteten Telomeren der Chromosomen zu finden. Der Abstand zwischen Genen in *D. discoideum* beträgt kaum 800 bp. Innerhalb dieser Zwischengensequenzen liegen regulatorische Bereiche, wie Promotoren und Terminatoren. Vermutlich sind weitestgehend alle codierenden Bereiche der Chromosomen euchromatisch. Die Retrotransposition von TRE5-A-Elementen in die Nähe von tRNA-Genen könnte jedoch eine Heterochromatisierung benachbarter Genombereiche initiieren, da die Transkription von Retrotransposons über epigenetische Modifikationen, wie beispielsweise DNA-Methylierung, die Modifikation von Histon-Seitenketten und

Diskussion

Veränderungen in der Chromatinkondensation, stillgelegt wird (Slotkin & Martienssen; 2007). Eine Heterochromatisierung der TRE5-A-Elemente in *D. discoideum* ist daher vorstellbar, wurde bisher aber noch nicht gezeigt.

Die für die positionsspezifische Integration des Retrotransposons TRE5-A notwendigen tRNA-Gene sind im Genom von *D. discoideum* ubiquitär verteilt. Eine Heterochromatisierung von integrierten TRE5-A-Elementen würde demzufolge an vielen euchromatischen Bereichen in der Nähe von tRNA-Genen stattfinden. Möglich wäre, dass durch die Interaktion von CbfA mit dem C-Modul von TRE5-A-Retrotransposons eine Heterochromatisierung benachbarter Regionen unterbunden werden würde. Durch diese Verhinderung der Heterochromatisierung der Retro-Elemente würden auch die Integrationsstellen, die durch ein bereits zuvor integriertes Retrotransposon entstanden sind, für weitere Integrationen zur Verfügung stehen. Dadurch ist es vorstellbar, dass erst durch die JmjC-Domäne von CbfA weitere Integrationen von TRE5-A-Retrotransposons stattfinden könnten.

Eine eventuelle Beteiligung der JmjC-Domäne von CbfA an der Ausbereitung einer Heterochromatisierung hätte Parallelen zur Kontrolle von Transposons in *Neurospora crassa* (Honda *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde das CbfA-ähnliche Protein DMM-1 (DNA Methylation Modulator-1) aus dem filamentösen Pilz untersucht.

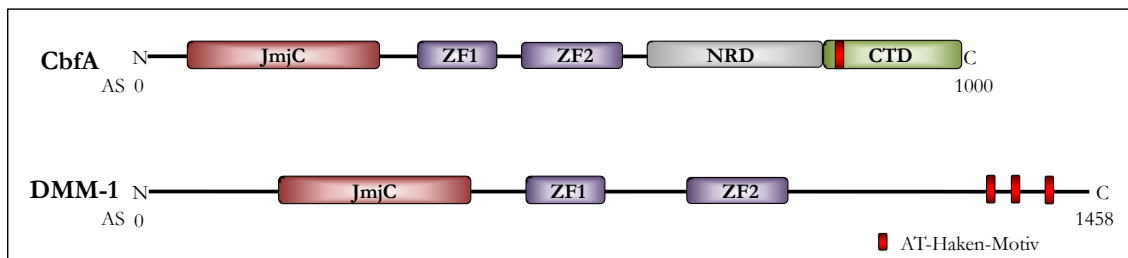


Abbildung 52: Proteinstruktur von CbfA aus *Dictyostelium discoideum* und DMM-1 aus *Neurospora crassa*.

DMM-1 besitzt wie CbfA eine JmjC-Domäne im N-Terminus. Auch die auf die JmjC-Domäne zwei folgenden Cystein-reichen Bereiche von DMM-1 könnten auf eine Homologie zu den Zinkfingermotiven CbfAs hindeuten. Außerdem besitzt DMM-1 drei AT-Hakenmotive am C-terminalen Ende. DMM-1 und CbfA scheinen orthologe Proteine zu sein (Abbildung 52). In der Arbeit von Honda *et al.* (2010) wurde eine Protein-Protein-Interaktion von DMM-1 mit dem bis dahin hypothetischen Protein NCU08289 entdeckt, das daraufhin als DMM-2 bezeichnet wurde. DMM-2 besitzt eine für filamentöse Pilze typische $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ -DNA-bindende Domäne, die CGG- und CCG-Trinukleotide erkennt (MacPherson *et al.*, 2006; Tamaru, 2010). In Mutanten, die kein DMM-1 und auch nicht das DMM-1-assoziierte Protein DMM-2 exprimierten, wurde ektopisch eine Ausbreitung von

DNA-Methylierung, H3K9-Methylierung sowie eine Ausbreitung der Bindung von HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) am Chromatin ausgehend von Transposonrelikten festgestellt. Daraufhin wurde das JmjC-Protein hinsichtlich einer demethylierenden Funktion an Histon-Seitenketten untersucht. Isoliertes DMM-1 zeigte allerdings keine Aktivität als Histon-Demethylase. Auch einer Interaktion von DMM-1 mit unmethylierten und methylierten H3- oder H4-Seitenketten war nicht zu beobachten. Es fiel jedoch auf, dass die Lokalisierung von DMM-1 und DMM-2 abhängig von einer H3K9-Trimethylierung war und dass diese Proteine wie auch HP1 an der Grenze zwischen Hetero- und Euchromatin konzentriert zu finden waren. Es wurde vermutet, dass HP1/DIM-2 (DIM-2: DNA-Methyltransferase; *Defective in Methylation-2*) innerhalb von bereits H3K9-methylierten Histon-Seitenketten der Transposonsequenzen transient binden, um von dort aus DNA-Methylierungen bis zu den Enden der Elemente zu vermitteln. Zu diesen Sequenzbereichsenden wurde dann wahrscheinlich der DMM-Komplex rekrutiert, wodurch eine weitere Ausbreitung der Heterochromatisierung unterbunden wurde. Bei Abwesenheit von DMM-1/DMM-2 führte der HP1/DIM-2-Komplex weitere DNA-Methylierungen entlang der Chromosomen durch, ohne dass eine H3K9-Trimethylierung vorhanden war. Die genauen molekularen Abläufe, um eine Ausbreitung der Heterochromatisierung über DNA-Methylierung und H3K9-Methylierung zu verhindern, konnten bisher für *Neurospora crassa* jedoch nicht aufgeklärt werden. Es wurde aber vermutet, dass die JmjC-Domäne von DMM-1 an der Entfernung von H3K9-Trimethylierungen über Transposonsequenzen hinaus beteiligt ist.

Zusammenfassend wäre vorstellbar, dass eventuell heterochromatische TRE5-A-Elemente anhand der H3K9-Trimethylierung mittels dem PHD-ähnlichen Zinkfingers von CbfA erkannt werden und durch die putative Funktion der JmjC-Domäne eine Ausbreitung der Heterochromatisierung auf in der Nähe gelegenen Genen verhindert werden würde.

4.7 RNA-Interferenz und Methylierung beeinflussen die Aktivität von Retrotransposons

Die Regulation der Plus- und der Minus-Strang-Transkription von TRE5-A in Abhängigkeit von CbfA ließ die Vermutung aufkommen, dass der Transkriptionsregulator in Verbindung mit einem PTGS-Mechanismus an dem *Silencing* des Retrotransposons beteiligt ist. Dennoch zeigt TRE5-A eine beachtliche Retrotranspositions-Aktivität in *D. discoideum*. Im Vergleich zu den LTR-Retrotransposons DIRS-1 und Skipper, die durch Proteine der RNA-Interferenz in ihrer Aktivität beeinträchtigt wurden (Kuhlmann et al., 2005), sollte untersucht werden, ob TRE5-A in gleichem Maße einem *Silencing* unterliegt.

Transposable Retroelemente sind in der Lage, ihre Transkriptkopie unter Verwendung des Transkriptionsapparates der Zelle zu erstellen und nach reverser Transkription an einer anderen Stelle im Genom des Wirtsorganismus zu integrieren. Dabei können durch die Integration des Retrotransposons Gene zerstört werden und Mutationen auftreten, die dem Wirt schaden. Post-transkriptionelles *Silencing* von Retrotransposon-Transkripten könnte die Zelle vor Transpositionseignissen schützen, indem die RNA-Intermediate der Retrotransposons abgebaut und eine weitere Transkription des transposablen Elementes durch post-translationale Heterochromatisierung unterbunden wird (Grewal & Elgin, 2007; Matzke *et al.*, 2007; Zaratiegui *et al.*, 2007).

In dem RNA-Interferenz-Mechanismus spielen kleine RNA-Moleküle, die erstmalig in *C. elegans* entdeckt wurden, eine entscheidende Rolle (Lee *et al.*, 1993). Diese 18-26nt langen RNAs können anhand ihrer Entstehung in zwei Klassen eingeteilt werden. Die *micro* RNAs (miRNAs) werden aus sogenannten Haarnadelstrukturen (*Hairpin*) der RNA prozessiert, während *small interfering* RNAs (siRNAs) aus doppelsträngigen RNA-Transkripten (dsRNA) gebildet werden. Für die Herstellung der RNAs aus den Vorläufermolekülen beider Gruppen ist das RNase III-ähnliche Protein Dicer zuständig. Die kleinen RNA-Moleküle werden in einem Effektor-Komplex (RISC; *RNA-Induced Silencing Complex*), der Proteine der Argonaut-Familie enthält, integriert und führen diesen zur Ziel-mRNA. Durch die komplementäre Bindung des RNA-Moleküls mit der Ziel-mRNA kann RISC das Transkript spalten, wodurch eine Translation verhindert wird und die Stilllegung des Genes stattfindet.

Für die Stilllegung von Retrotransposons in *Drosophila* wird vermutet, dass für die Herstellung von siRNA-Molekülen doppelsträngige RNA durch Sense- und Antisense-Transkription des Retrotransposons verwendet wird und durch Loquacious und Dicer-2 diese zu siRNAs prozessiert werden (Obbard & Finnegan, 2008; Czech *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2008). Daraufhin interagieren Argonaut-2 und siRNA, wodurch die Degradierung von transposablen Elementen stattfinden kann.

In *D. discoideum* hingegen sind RNA-abhängige RNA-Polymerasen (RdRPs; *RNA-directed RNA-Polymerases*) an der Bildung von siRNAs beteiligt (Martens *et al.*, 2002). Auch hier wird wahrscheinlich doppelsträngige RNA durch Transkription in Antisense-Richtung erstellt. Diese wird durch eine dsRNase in ~23nt langen RNA-Molekülen prozessiert. Die kleinen RNAs dienen RNA-abhängigen RNA-Polymerasen als Primersequenzen entweder für die weitere Transkription der Antisense-RNA an der Ziel-mRNA, wodurch vermehrt siRNAs gebildet werden können, oder zum Abbau der Ziel-mRNA unter Verwendung eines RISC-Homologs.

Die RNA-abhängigen RNA-Polymerasen RrpA, RrpB und RrpC von *D. discoideum* spielen daher eine zentrale Rolle in der RNA-Interferenz. RrpA und RrpB sind eng miteinander verwandt und variieren in ihrer Proteinsequenz in nur 49 Aminosäuren. Dass RrpB kein Pseudogen darstellt, konnte aufgrund einer Transkription des Genes nachgewiesen werden (Martens *et al.*, 2002). RrpC hingegen zeigt eine Sequenzähnlichkeit zu RrpA von nur 63 % (Martens *et al.*, 2002). Außergewöhnlich für die RdRPs aus *D. discoideum* ist jedoch eine N-terminale Verlängerung der Enzyme. Diese zeigte eine Homologie zur Helikase-Domäne von Dicer aus *Drosophila* und *Caenorhabditis*. Die in *D. discoideum* identifizierten Dicer-ähnlichen Proteine DrnA und DrnB hingegen besitzen keine Helikase-Domäne. Ein *Domain-Swapping* von Dicer auf die RdRPs scheint wahrscheinlich (Martens *et al.*, 2002).

Dass RNA-Interferenz die Aktivität von *Dictyostelium*-Retrotransposons beeinflusst, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden (Kap. 3.2). Die LTR-Retrotransposons DIRS-1 und Skipper wurden durch die Funktion der RdRPs in ihrer Aktivität beeinträchtigt. Während die Expression von Skipper durch die Aktivität von RrpA und RrpC verringert wurde, konnte für DIRS-1 eine Erniedrigung der Transkriptmenge nur durch RrpC festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden durch *Northern-Blot*-Analysen in der Arbeit von Kuhlmann *et al.* (2005) ebenfalls gezeigt. Unterschiedliche Beteiligungen der RdRPs an der Stilllegung der Retrotransposons lassen auf verschiedene Regulationsmechanismen schließen.

Vermutlich wird auch die Aktivität des Non-LTR-Retrotransposons TRE5-A durch RrpA und RrpC erniedrigt, da ein *Knock-out* der Gene zu einer moderat erhöhten Transkriptmenge des Retrotransposons führte. In diesem Zusammenhang könnte ein Mitwirken des C-Modul-bindenden Faktors A in der RNA-Interferenz aufgrund der Aktivierung der Plus- und der Minus-Strang-RNA-Transkription vermutet werden, da die gebildete dsRNA prinzipiell zur Herstellung von siRNAs dienen könnte. Das der PTGS-Mechanismus weniger sensitiv auf die Transkriptmenge von TRE5-A als auf DIRS-1 oder Skipper reagiert, könnte an Unterschieden während des Transpositionsmechanismus der Retrotransposons liegen. Das ORF1-Protein von Non-LTR-Retrotransposons bindet direkt nach der Translation an ein RNA-Transkript des Retro-Elementes, wie es beispielsweise bei humanen L1-Elementen stattfindet und als *cis*-Präferenz bezeichnet wird (Wei *et al.*, 2001). Dadurch wird wahrscheinlich auch in Verbindung mit ORF2-Proteinen ein Ribonukleopartikel gebildet, das als Präintegrationskomplex eine wesentliche Rolle für die Retrotransposition spielt. Vermutlich schützt die Bindung von ORF1-Proteinen an Transkripten von Retrotransposons vor einer Entstehung größerer Mengen an dsRNAs und verhindert somit einen Abbau der Retrotransposon-RNA über den PTGS-

Mechanismus. In der Arbeit von Hentschel *et al.* (2001) konnte gezeigt werden, dass ORF1-Proteine *in vivo* große zytoplasmatische Komplexe in *D. discoideum*-Zellen bilden. Die beschriebene Hypothese kann zusätzlich dadurch untermauert werden, dass siRNAs für eine Degradation der TRE5-A-Transkripte nicht in signifikanter Menge von RdRPs prozessiert werden (Larsson *et al.*, 2008; Winckler, persönliche Mitteilung) und dadurch die Aktivität der RdRPs nur eine geringe Auswirkung auf die TRE5-A-Transkriptmenge zeigte. Ein Protein, das in *D. discoideum* die RNA-Maschinerie kontrolliert, scheint die putative RNA-Helikase Helf darzustellen. Dieses Protein agiert als Suppressor der RNA-Interferenz, indem es dsRNAs entwindet und dadurch die Bildung von siRNAs verhindert (Popova *et al.*, 2006). Überschreitet die Menge an dsRNAs jedoch einen kritischen Level, reicht die Entwindungsaktivität von Helf nicht mehr aus, was durch vermehrte siRNA-Prozessierung zur Aktivierung der RNA-Interferenz führen kann. Überraschenderweise zeigte ein *Knock-out* des *helf*-Gens jedoch eine Erhöhung der DIRS-1-Transkripte. Durch den funktionellen Verlust des Helf-Proteins war eine Aktivierung der RNA-Interferenz zu erwarten gewesen, was jedoch zu einer Degradation der DIRS-1-Transkripte geführt hätte. Neben der RNA-Interferenz kann eine Genstilllegung auch durch die Methylierung der DNA erfolgen. In *D. discoideum* wird diese DNA-Methylierung an der Base Cytosin durch die DNA-Methyltransferase DnmA vermittelt, die große Sequenzähnlichkeit zum humanen Dnmt2-Protein zeigt (Kuhlmann *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine verstärkte Transkriptionsaktivierung in einem *dnmA-Knockout* für Skipper beobachtet werden. Skipper besitzt Methylierungen an asymmetrischen Cytosinresten, die besonders in codierenden Regionen der drei offenen Leserahmen vorhanden sind. Auch in den LTRs, wenn auch in geringerem Maße, sind DNA-Methylierungen zu finden (Kuhlmann *et al.*, 2005). In *dnmA*-Zellen werden diese Methylierungen nicht mehr vermittelt. Die Promotorsequenz im Skipper-LTR sowie die ORFs sind somit dem Transkriptionsapparat zugänglich, wodurch eine erhöhte Transkriptmenge gemessen werden konnte. Obwohl DIRS-1 ebenfalls asymmetrische C-Methylierung besitzt, schien die Transkription dieses Retrotransposon durch einen Verlust der DNA-Methyltransferase nicht aktiviert zu werden. Die Methylierungen von DIRS-1 sind im Gegensatz zu Skipper besonders in den LTRs vorhanden (Kuhlmann *et al.*, 2005). DIRS-1-Elemente sind vorwiegend an der Bildung der Centromer-Region beteiligt (Eichinger *et al.*, 2005; Glöckner & Heide, 2009). Diese werden dem konstitutiven Heterochromatin zugeordnet. Charakteristisch für Heterochromatin sind neben DNA-Methylierungen auch post-translationale Histon-Modifikationen. Für die Stilllegung der DIRS-1-Elemente werden neben DNA-Methylierungen auch Histonmethylierungen des Lysins an Position 9 von Histon H3

vorgenommen, damit eine dauerhafte Heterochromatisierung besteht. Demzufolge könnte eine Aktivierung der DIRS-1-Expression, trotz des *dnmA-Knock-outs*, nicht stattfinden. DIRS-1-Elemente sind aber auch in euchromatischen Chromatinbereichen im Genom vorhanden, wo deren H3-Histone auch eine H3K4-Trimethylierung tragen (Kapitel 3.6.3). Eine Stilllegung der Transkription wäre in diesen Bereichen beispielsweise durch DNA-Methylierung möglich, was jedoch aufgrund der Messung in *dnmA*-Zellen nicht bestätigt wurde. Für DIRS-1 scheint vorrangig eine post-transkriptionelle Genstilllegung durch den RNAi-Mechanismus stattzufinden.

Die Transkription des Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A.1 wurde ebenfalls nicht durch den funktionellen Verlust der DNA-Methyltransferase beeinflusst. Ob TRE5-A.1 DNA-Methylierungen besitzt, ist bisher nicht untersucht worden.

Neben einer Stilllegung von Retrotransposons kann eine Aktivierung der Transkription durch Histon-Modifikationen hervorgerufen werden. Diese Modifikation wird durch eine Trimethylierung am Lysin 4 des Histons H3 durch die Histon-Methyltransferase Set1 in *D. discoideum* vermittelt. In der Untersuchung konnte gezeigt werden, dass Set1 eine Aktivierung der DIRS-1-Transkription herbeiführt. DIRS-1 ist, wie bereits erwähnt, ebenfalls in euchromatischen Regionen integriert, in der Histone die genannte Methylierung tragen. In *set1*-Zellen wurde eine verminderte DIRS-1-Transkriptmenge beobachtet, da durch die fehlende Histon-Markierung keine Amplifikation der DIRS-1 Transkripte erfolgen konnte.

Eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität war auch bei dem Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A.1, wenn auch nur sehr gering, zu erkennen. In wie weit die DNA-Bindung von CbfA mit dem C-Modul von TRE5-A-Elementen und die in dieser Arbeit identifizierte Protein-Protein-Interaktion von CbfA mit Set1 eine Rolle in der Aktivierung spielt, muss noch untersucht werden.

Für Skipper ist keine Beeinflussung der Expression durch Set1 zu erkennen. Die Aktivität von Skipper scheint durch *post-transcriptional gene-silencing* und DNA-Methylierung in besonderem Maße negativ reguliert, da Skipper in alle Bereiche des Genoms integriert (Glöckner *et al.*, 2001) und vermutlich für die Zelle schädliche Mutationen hervorrufen könnte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten transposablen Elemente DIRS-1 und Skipper in ihrer Aktivität durch *post-transcriptional gene-silencing* reguliert werden. Dabei greift dieser Mechanismus durch die RNA-Interferenz teilweise mit der DNA-Methylierung ineinander. Das Non-LTR-Retrotransposon TRE5-A scheint ebenfalls durch den PTGS-Maschinerie beeinflusst zu werden, wenn auch weniger

stark. Dass die Aktivität der TRE5-A-Elemente durch den PTGS-Mechanismus nur moderat beeinträchtigt wird, kann durch den Retrotranspositions-Mechanismus erklärt werden, da ORF1-Proteine vermutlich durch Bindung der Retrotransposon-Transkripte ein Schutz der RNA gewährleisten.

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden für den C-Modul-bindenden Faktor A Untersuchungen bezüglich der vermittelten Genregulation während der vegetativen Wachstumsphase und der multizellulären Entwicklung durchgeführt. Im Hinblick auf die JumonjiC-Domäne von CbfA wurden erste Erkenntnisse zur Funktion dieser Domäne gewonnen. Zur weiteren Charakterisierung der Proteindomäne bedarf es weiterführender Experimente.

Zur Klärung der dreidimensionalen Struktur und der enzymatischen Funktion der JumonjiC-Domäne CbfAs wäre eine Expression der Proteindomäne erforderlich. Die Herstellung des nativen Proteins der JmjC-Domäne über bakterielle Expressionssysteme misslang trotz umfangreicher Optimierungsversuche. Deshalb könnten weitere Expressionsstudien mit neuen JmjC-Konstrukten von CbfA erfolgen. Eine Expression der JmjC-Domäne in Hefe oder unter Verwendung des Baculovirussystems in Insektenzellen könnte dafür in Betracht gezogen werden. Ein funktioneller Nachweis der vermuteten Demethylasefunktion der JmjC-Domäne wäre anhand der aufgereinigten Proteindomäne durch einen Histon-Demethylase-*Assay* möglich.

In diesem Zusammenhang könnten auch biochemische Experimente für alle in *D. discoideum* vorkommenden JmjC-Proteine vergleichend durchgeführt werden, wodurch eventuelle Demethylase-Funktionen dieser Proteine charakterisiert werden könnten.

Für die Überlegung, dass CbfA an der Regulation der Transkriptmengen unterschiedlicher Retrotransposons beteiligt ist und vermutlich somit im PTGS-Mechanismus involviert ist, könnten *Northern Blot*-Analysen in Abhängigkeit von CbfA für die Plus- und Minus-Strang-Transkription der jeweiligen Retrotransposons durchgeführt werden. Zusätzlich könnte die CbfA-abhängige Regulation von Genen untersucht werden, die für Proteine des PTGS-Mechanismus codieren. Neue Daten aus RNA-Sequenzierungen deuten darauf hin, dass CbfA die Expression von *agnC* und *agnE* aus *Dictyostelium discoideum* beeinflusst. Diese Gene codieren für Argonaut-Proteine, die eventuell in einem RISC-homologen Komplex agieren.

Um die Hypothese zu stützen, dass die JmjC-Domäne an der Integration des Retrotransposons TRE5-A beteiligt ist, könnten Retrotranspositionsstudien mit einem CbfA-Derivat erfolgen, dessen JmjC-Domäne deletiert oder funktionell inaktiviert ist.

5 Zusammenfassung

Der in dieser Arbeit untersuchte C-Modul-bindende Faktor A (CbfA) aus *Dictyostelium discoideum* wurde aufgrund seiner Interaktion mit einem spezifischen DNA-Bereich des Retrotransposons TRE5-A erstmalig beschrieben. In vorangegangenen Arbeiten zur Funktion von CbfA wurde bereits gezeigt, dass die CbfA-depletierte Mutante JH.D spezifische Phänotypen ausbildet. Zu diesen zählen veränderte Pino- und Phagozytoseraten, das Ausbleiben der multizellulären Entwicklung sowie die Verminderung der Transkriptmenge und Retrotranspositionsrate des transposablen Elementes TRE5-A. Der Mangel an CbfA und die dadurch bedingte fehlende Genregulation stellen die Ursache dieser phänotypischen Veränderungen dar. CbfA ist ein Multidomänenprotein, das neben einer JumonjiC-Domäne (JmjC) zwei Zinkfinger motive, einen Asparagin-reichen Bereich und eine genregulatorische Carboxy-terminale Domäne (CTD) besitzt.

In der vorliegenden Arbeit wurde CbfA hinsichtlich seiner Funktion als Transkriptionsregulator näher untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei in der Analyse der Genregulation durch die JumonjiC-Domäne von CbfA auf epigenetischer Ebene.

Durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) wurde *in vivo* nachgewiesen, dass CbfA spezifische Wechselwirkungen mit Promotorsequenzen einzelner Gene eingeht und vermutlich dadurch eine Regulation der Genexpression in der Wachstumsphase vermittelt. Desweiteren wurde gezeigt, dass CbfA den Promotor des entwicklungsrelevanten Gens *acaA* während der multizellulären Entwicklung bindet und somit in der Induktion der Entwicklungsphase involviert ist.

Die enzymatische Funktion einiger JumonjiC-Domänen als Fe²⁺- und 2-OG-abhängige Histon-Demethylasen lässt eine Chromatin-regulierende Funktion von CbfA vermuten. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Histone-Methylierungen mittels Immunofluoreszenz und ChIP analysiert. Hinsichtlich des methylierten Chromatinmusters konnten in der CbfA-Mutante keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Auch ein Vergleich von Histon-Methylierungen der Promotorsequenzen CbfA-abhängiger Gene ließ keine putative Histon-Demethylase-Aktivität der JmjC-Domäne erkennen. Das deutete darauf hin, dass die enzymatische Funktion der JmjC-Domäne von CbfA in der vegetativen Wachstumsphase nicht an einer epigenetischen Genregulation beteiligt ist. Im Gegensatz dazu wurde in einem Peptid-pull-down-Assay gezeigt, dass CbfA die Trimethylierung am Histon H3 von Lysin 9 erkennt. Dies schien allerdings nicht unmittelbar zu einer Demethylierung der untersuchten Histon-Seitenketten zu führen.

Zusammenfassung

Die Analyse verschiedener CbfA-Mutanten wies darauf hin, dass das erste Zinkfingermotiv für die Vermittlung der CbfA-abhängigen Genregulation in der Entwicklungsphase von *D. discoideum* essentiell ist. Wiederum wurde gefunden, dass die enzymatische Funktion der JmjC-Domäne nicht benötigt wird, da trotz einer Deaktivierung der Enzymaktivität der JmjC-Domäne mittels gerichteter Mutagenese eine CbfA-vermittelte Induktion der multizellulären Entwicklung ähnlich wie im Wildtyp beobachtet wurde.

Für weitere Funktionalitätstests und zur Strukturaufklärung der JmjC-Domäne wurde die Proteindomäne in Bakterien heterolog exprimiert und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt. Nach der Rückfaltung des Proteins führte das Aufkonzentrieren der Proteindomäne jedoch zur erneuten Bildung von Proteinaggregaten. Es konnte in diesem Expressionssystem kein funktionelles Protein für Strukturuntersuchungen gewonnen werden.

Zur Identifizierung von möglichen Interaktionspartnern der JmjC-Domäne wurde ein cDNA-Bank-Screening in einem Hefe-Zwei-Hybrid-System durchgeführt. Es wurden 34 mögliche Interaktionspartner identifiziert, von denen nur die Histon-Methyltransferase Set1 in einer anschließenden *in vitro*-Coimmunopräzipitation eine direkte Interaktion mit CbfA zeigte.

Die carboxy-terminale Domäne von CbfA ist essentiell für die Akkumulation der TRE5-A-RNAs in *D. discoideum*-Zellen. In dieser Arbeit wurden neben TRE5-A auch andere *D. discoideum* Retrotransposons hinsichtlich der Abhängigkeit ihrer Expression von CbfA untersucht. Es wurde gefunden, dass das Retrotransposon Skipper in seiner Expression ebenfalls durch CbfA reguliert wird. Die Erhöhung der Transkriptmengen von TRE5-A und Skipper deuteten darauf hin, dass die Aktivitäten dieser Retrotransposons über eine posttranskriptionelle Regulation in Abhängigkeit von CbfA beeinflusst werden könnten.

6 Summary

The C-module-binding factor A (Cbfa) from *Dictyostelium discoideum* was isolated and characterized based on its specific interaction with a DNA sequence in the retrotransposon TRE5-A. Previous studies have shown that the lack of Cbfa leads to specific phenotypes in the mutant JH.D. These are characterized by altered pino- and phagocytosis rates, the failure of mutant cells to go through multicellular development, and the decrease of both the steady-state transcript level and retrotransposition rate of the retrotransposon TRE5-A. Cbfa is a multi-domain protein containing a JumonjiC domain (JmjC), two zinc finger motifs, an asparagine-rich region and a C-terminal domain (CTD).

The aim of the present work was to analyze the function of Cbfa in gene expression during both vegetative growth and multicellular development. Moreover, the main focus was to investigate the putative role of the JumonjiC domain of Cbfa in epigenetic gene regulation.

In this study it is demonstrated using chromatin-immunoprecipitations (ChIP) that Cbfa interacts *in vivo* with the promoter region of genes regulated by Cbfa during the growth phase. ChIP analyses further revealed that during the multicellular development Cbfa binds to the promotor of the *acaA* gene encoding the aggregation-specific adenylyl cyclase and therefore it is involved in the induction of the developmental stage.

To investigate the supposed enzymatic function of the JmjC domain as a Fe(II) and 2-OG-dependent histone demethylase, the particular methylation states of histone H3 were analyzed in wild type AX2-cells compared to the Cbfa mutant JH.D by using immunofluorescence and ChIP. However, no differences regarding methylated chromatin patterns of lysine 4 and 9 of histone H3 could be observed. A comparison of the histone methylation in promotor sequences of Cbfa-dependent genes revealed no putative histone demethylase activity of the JmjC domain. This result suggested that the assumed enzymatic function of the JmjC domain of Cbfa is not involved in an epigenetic gene regulation in the vegetative growth stage of *Dictyostelium discoideum*.

However, peptide pull-down-assays demonstrated that Cbfa detects the trimethylation of lysine 9 in histone H3, but this does not lead to demethylation of histone H3 at either lysine 4 or lysine 9.

Investigation of Cbfa mutants pointed out that the first zinc finger is essential for the Cbfa-dependent gene regulation in the developmental stage of *D. discoideum*. However, it was again observed that the inactivation of the enzymatic activity of the JmjC domain via

Summary

site-directed mutagenesis did not compromise the CbfA function as an essential regulator of gene expression during multicellular development.

For functional analysis and structure determination the JmjC domain was expressed in *E. coli* and the recombinant protein was purified under denatured conditions. After refolding it was not possible to concentrate the soluble protein without formation of protein aggregates. Therefore no active protein could be obtained for structural investigations in this expression system.

For the identification of possible interaction partners of the CbfA JmjC domain a yeast two-hybrid screen was performed using different *D. discoideum* cDNA libraries. A total of 34 putative interaction partners could be identified, but only the direct interaction between CbfA and the histone methyltransferase Set1 could be confirmed by *in vitro* co-immunoprecipitation experiments.

The carboxy-terminal domain of CbfA is essential for the accumulation of TRE5-A transcripts in *D. discoideum* cells. In this work the dependence on CbfA of other retrotransposons in the *D. discoideum* genome was investigated. It was found that the expression of the retrotransposon Skipper is affected by CbfA. The CbfA-dependent increase of the transcript level of TRE5-A and Skipper indicated that the activities of the retrotransposons may be regulated by a posttranscriptional gene silencing mechanism.

7 Literaturverzeichnis

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.E. (2003): Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* **421(6925)**: 859-863.
- Aasland, R., Gibson, T.J., Stewart, A.F. (1995): The PHD finger: implications for chromatin mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem. Sci.* **20(2)**: 56-59.
- Agger, K., Christensen, J., Cloos, P.A., Helin, K. (2008): The emerging function of histone demethylases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18(2)**: 159-168.
- Alvarez-Curto, E., Rozen, D.E., Ritchie, A.V., Fouquet, C., Baldauf, S.L., Schaap, P. (2005): Evolutionary origin of cAMP-based chemoattraction in the social amoebas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 6385-6390.
- Aravind L., & Landsman, D. (1998): AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res.* **26(19)**: 4413-4421.
- Aravind, L. & Koonon, E.V. (2001): The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarat- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biol.* **2(3)**.
- Aubry, L., Maeda, M., Insall, R., Devreotes, P.N. & Firtel, R.A. (1997): The *Dictyostelium* mitogen-activated protein kinase ERK2 is regulated by Ras and cAMP-dependent protein kinase (PKA) and mediates PKA function. *J. Biol. Chem.* **272**, 3883-3886.
- Ausubel, F.M., Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.G.; Smith, J. A.; Struhl, K. (1999): short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology (4th.ed.). USA, John Wiley & Sons, Inc.
- Balciunas, D. & Ronne, H. (2000): Evidence of domain swapping within the Jumonji family of transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **25(6)**: 274-276.
- Baldauf, S.L. & Doolittle, W.F. (1997): Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94(22)**: 12007-12012.
- Baldauf, S.L.; Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., Doolittle, W.F. (2000): A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**: 972-977.
- Bapteste, E., Brinkmann, H., Lee, J.A., Moore, D.V., Sensen C.W., Gordon, P., Duruflé, L., Gaasterland, T., Lopez, P., Müller, M., Philippe, H. (2002): The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(3)**: 1414-1419.
- Beck, P. (2002): Dissertation: Etablierung eines in vivo Testsystems zur Untersuchung der Mobilität tRNA-Gen-gerichteter Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum*.
- Beck P., Dingermann, T., Winckler, T. (2002): Transfer RNA gene-targeted retrotransposition of *Dictyostelium* TRE5-A into a chromosomal UMP synthase gene trap. *J. Mol. Biol.* **318(2)**: 273-285.
- Bedford M.T. & Richard, S. (2005): Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* **18(3)**: 263-272.
- Bernstein B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., Schreiber, S.L. (2002): Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(13)**: 8695-8700.
- Bernstein, B.E.; Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J. 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S. (2005): Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* **120(2)**: 169-181.

- Bettinger, B.T., Gilbert, D.M., Amberg, D.C. (2004): Actin up in the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**(5): 410-415.
- Biémont, C. & Vieira, C. (2006): Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* **443**: 521-524.
- Bienz, M. (2006): The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. *Trends Biochem. Sci.* **31**(1): 35-40.
- Bilzer, A. Dölz, H., Reinhardt, A., Schmith, A., Siol, O., Winckler, T. (2010): The C-module-binding factor supports the amplification of TRE5-A retrotransposons in the *Dictyostelium discoideum* genome. *Eukaryotic Cell* (in press).
- Bilzer, A. (2010): Funktion des Transkriptionsfaktors CbfA in *Dictyostelium discoideum*.
- Bozzaro S. & Ponte, E. (1995): Cell adhesion in the life cycle of *Dictyostelium*. *Experientia*. **51**(12): 1175-1188.
- Brayer K.J. & Segal, D.J. (2008): Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell Biochem. Biophys.* **50**(3): 111-131.
- Brefeld, O. (1869): *Dictyostelium mucoroides*. Ein neuer Organismus aus der Verwandtschaft der Myxomyceten. *Abhandlung der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft Frankfurt* **7**: 85-107.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bukenberger, M., Dinger mann, T., Meissner, W., Seifart, K.H., Winckler, T. (1994): Isolation of transcription factor IIIC from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **220**(3): 839-846.
- Cabrita, L.D. & Bottomley, S.P. (2004): A practical guide to protein expression and refolding from inclusion bodies. *Biotechnol. Annu. Rev.* **10**: 31-50.
- Capy, P. (2005): Classification and nomenclature of retrotransposable elements. *Cytogenet. Genome Res.* **110**(1-4): 457-461.
- Chang, B., Chen, Y., Zhao, Y., Bruick, R.K. (2007): JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**(5849): 444-447.
- Chen, Z., Zang, J., Whetstine, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.H., Dai, S., Hagman, J., Hansen, K., Shi, Y., Zhang, G. (2006): Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* **25**(4): 691-702.
- Chisholm, R.L. & Firtel, R.A. (2004): Insights into morphogenesis from a simple developmental system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 531-541.
- Chisholm, R.L., Gaudet, P., Just, E.M., Pilcher, K.E., Fey, P., Merchant, S.N., Kibbe, W.A. (2006): dictyBase, the model organism database for *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **34**: D423-427.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., Helin, K. (2007): RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* **128**(6): 1063-1076.
- Chubb, J.R., Bloomfield, G., Xu, Q., Kaller, M., Ives, A., Skelton, J., Turner, B.M., Nellen, W., Shaulsky, G., Kay, R.R., Bickmore, W.A., Singer, R.H. (2006): Developmental timing in *Dictyostelium* is regulated by the Set1 histone methyltransferase. *Dev. Biol.* **292**(2): 519-532.
- Chung, T., Siol, O., Dinger mann, T., Winckler, T. (2007): Protein interactions involved in tRNA gene-specific integration of *Dictyostelium discoideum* non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol. Cell. Biol.* **24**(27): 8492-8501.
- Chung, W.J., Okamura, K., Martin, R., Lai, E.C. (2008): Endogenous RNA interference provides a somatic defense against *Drosophila* transposons. *Curr. Biol.* **18**(11): 795-802.

- Clarke, M. & Gomer, R.H. (1995): PSF and CMF, autocrine factors that regulate gene expression during growth and early development of *Dictyostelium*. *Experientia* **51**: 1124-1134.
- Clarke, M. & Madder, L. (2006): Phagocyte meets prey: uptake, internalization, and killing of bacteria by *Dictyostelium* amoebae. *Eur. J. Cell. Biol.* **85**(9-10): 1001-1010.
- Clifton, I.J., McDonough, M.A., Ehrismann, D., Kershaw, N.J., Garantino, N., Schofield, C.J. (2006): Structural studies on 2-oxoglutarat oxygenases and related doubled-stranded beta-helix fold proteins. *J. Inorg. Biochem.* **100**(4): 644-669.
- Clissold, P.M. & Ponting, C.P. (2001): JmjC: cupin metalloenzyme-like domains in jumonji, hairless and phospholipase A2beta. *Trends Biochem. Sci.* **26**(1): 7-9.
- Cloos, P.A., Christensen, J., Agger, K., Maiolicas, A., Rappsilber, J., Antal, T., Hansen, K.H., Helin, K. (2006): The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature* **442**(7100): 307-11.
- Cotter, D.A., Sands, T.W., Viridy, K.J., North, M.J., Klein, G., Satre, M. (1992): Patterning of development in *Dictyostelium discoideum*: factors regulating growth, differentiation, spore dormancy, and germination. *Biochem. Cell Biol.* **70**: 892-919.
- Czech, B., Malone, C.D., Zhou, R., Stark, A., Schlingehayde, C., Dus, M., Perriman, N., Kellis, M., Wohlschlegel, J.A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., Brennecke, J. (2008): An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* **453**(7196): 798-802.
- Delcuve G.P., Rastegar, M., Davie, J.R. (2009): Epigenetic control. *J. Cell Physiol.* **219**(2): 243-250.
- Dinglay, S., Trewick, S.C., Lindahl, T., Sedgwick, B. (2000): Defective processing of methylated single-stranded DNA by *E. coli* AlkB mutants. *Genes Dev.* **14**(16): 2097-2105.
- Eichinger, L., Pachebat, J.A., Glöckner, G., Rajandream, M.A., Sugang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B.A., Rivero, F., Bankier, A.T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., Gaudet, P., Fey, P., Pilcher, K., Chen, G., Saunders, D., Sodergren, E., Davis, P., Kerhornou, A., Nie, X., Hall, N., Anjard, C., Hemphill, L., Bason, N., Farbrother, P., Desany, B., Just, E., Morio, T., Rost, R., Churcher, C., Cooper, J., Haydock, S., van Driessche, N., Cronin, A., Goodhead, I., Muzny, D., Mourier, T., Pain, A., Lu, M., Harper, D., Lindsay, R., Hauser, H., James, K., Quiles, M., Madan Babu, M., Saito, T., Buchrieser, C., Wardroper, A., Felder, M., Thangavelu, M., Johnson, D., Knights, A., Louseged, H., Mungall, K., Oliver, K., Price, C., Quail, M.A., Urushihara, H., Hernandez, J., Rabbinoiwitsch, E., Steffen, D., Sanders, M., Ma, J., Kohara, Y., Sharp, S., Simmonds, M., Spiegler, S., Tivey, A., Sugano, S., White, B., Walker, D., Woodward, J., Winckler, T., Tanaka, Y., Shaulsky, G., Schleicher, M., Weinstock, G., Rosenthal, A., Cox, E.C., Chisholm, R.L., Gibbs, R., Loomis, W.F., Platzer, M., Kay, R.R., Williams, J., Dear, P.H., Noegel, A.A., Barrell, B., Kuspa, A. (2005): The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **435**: 43-57.
- Eichler, E.E. & Sankoff, D. (2003): Structural dynamics of eukaryotic chromosome evolution. *Science* **301**(5634): 793-797.
- Falnes, P.O., Johansen, R.F., Seeberg, E. (2002): AlkB-mediated oxidative demethylation reverse DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature* **419**(6903): 178-182.
- Falnes, P.O. & Rognes, T. (2003): DNA repair by bacterial AlkB proteins. *Res. Microbiol.* **154**(8): 531-538.
- Falnes, P.O., Klungland, A., Alseth, I. (2007): Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* **145**(4): 1222-1232.

- Farbrother, P., Wagner, C., Na, J., Tunggal, B., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., Schleicher, M., Steinert, M., Eichinger, L. (2006): *Dictyostelium* transcriptional host cell response upon infection with Legionella. *Cell Microbiol.* **8**(3): 438-456.
- Fey, P., Gaudet, P., Curk, T., Zupan, B., Just, E.M., Basu, S., Merchant, S.N., Bushmanova, Y.A., Shaulsky, G., Kibbe, W.A., Chisholm, R.L. (2009): dictyBase--a *Dictyostelium* bioinformatics resource update. *Nucleic Acids Res.* **37**: D515-519.
- Firtel, R.A. (1996): Interacting signaling pathways controlling multicellular development in *Dictyostelium*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**(5): 545-554.
- Fodor, B.D., Kubicek, S., Yonezawa, M., O'Sullivan, R.J., Sengupta, R., Perez-Burgos, L., Opravil, S., Mechtler, K., Schotta, G., Jenuwein, T. (2006): Jmjd2b antagonizes H3K9 trimethylation at pericentric heterochromatin on mammalian cells. *Genes Dev.* **20**(12): 1557-1562.
- Gaudet, P., Pilcher, K.E., Fey, P., Chisholm, R.L. (2007): Transformation of *Dictyostelium discoideum* with plasmid DNA. *Nature Protocols* **2**: 1317-1324.
- Geier, A., Horn, J., Dingermaier, T. & Winckler, T. (1996): A nuclear protein factor binds specifically to the 3'-regulatory module of the long-interspersed-nuclear-element-like *Dictyostelium* repetitive element. *Eur. J. Biochem.* **241**: 70-76.
- Gerisch, G. & Hess, B. (1974): Cyclic-AMP-controlled oscillations in suspended *Dictyostelium* cells: their relation to morphogenetic cell interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 2118-2122.
- Glöckner, G., Szafranski, K., Winckler, T., Dingermaier, T., Quail, M.A., Cox, E., Eichinger, L., Noegel, A.A., Rosenthal, A. (2001). The complex repeats of *Dictyostelium discoideum*. *Genome Res.* **11**(4): 585-594.
- Glöckner, G., Eichinger, L., Szafranski, K., Pachebat, J.A., Bankier, A.T., Dear, P.H., Lehmann, R., Baumgart, C., Parra, G., Abril, J.F., Guigo, R., Kumpf, K., Tunggal, B., Cox, E., Quail, M.A., Platzer, M., Rosenthal, A., Noegel, A.A., Dictyostelium Genome Sequencing Consortium (2002): Sequence and analysis of chromosome 2 of *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **418**(6893): 79-85.
- Glöckner G. & Heidel, A.J. (2009): Centromere sequence and dynamics in *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic Acids Res.* **37**(6): 1809-1816.
- Grewal, S.I. & Elgin, S.C. (2007): Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* **447**(7143): 399-406.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol. Biol.* **166**(4): 557-580.
- Harwood, A.J., Hopper, N.A., Simon, M.N., Driscoll, D.M., Veron, M., Williams, J.G. (1992): Culmination in *Dictyostelium* is regulated by the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **69**: 615-624.
- Hecht, A. & Grunstein, M. (1999): Mapping DNA interaction sites of chromosomal proteins using immunoprecipitation and polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.* **304**: 399-414.
- Hentschel, U.; Zündorf, I.; Dingermaier, T.; Winckler, T. (2001): On the problem of establishing the subcellular localization of *Dictyostelium* retrotransposon TRE5-A proteins by biochemical analysis of nuclear extracts. *Anal. Biochem.* **296**(1): 83-91.
- Hoffmann, J., Schumann, G., Borschert, G., Gösse, R., Bach, M., Bertling, W.M., Marschalek, R., Dingermaier, T. (1991): Transfer RNA Genes from *Dictyostelium discoideum* are frequently associated with repetitive elements and contain consensus boxes in their 5' and 3'-flanking regions. *J. Mol. Biol.* **222**(3): 537-552.
- Honda, S., Lewis, Z.A., Huarte, M., Cho, L.Y., David, L.L., Shi, Y., Selker, E.U. (2010): The DMM complex reverts spreading of DNA methylation from transposons to nearby genes in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* **25**(5): 443-454.

- Hong, S., Cho, Y.W., Yu, L.R., Veenstra, T.D., Ge, K.** (2007): Identification of JmjC domain containing UTX and JMJD3 histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(47): 18439-18444.
- Horn, J., Dietz-Schmidt, A., Zündorf, I., Garin, J., Dingermaier, T., Winckler, T.** (1999): A *Dictyostelium* protein to distinct oligo(dA) x oligo (dT) DNA sequences in the C-module of the retrotransposon element DER. *Eur. J. Biochem.* **265**(1): 441-448.
- Hsia, D.A., Tepper, C.G., Pochampalli, M.R., Hsia, E.Y., Izumiya, C., Huerta, S.B., Wright, M.E., Chen, H.W., Kung, H.J., Izumiya, Y.** (2010): KDM8, a H3K36me2 histone demethylase that acts in the cyclin A1 coding region to regulate cancer cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**(21): 9671-9676.
- Iranfar, N.; Fuller, D. & Loomis, W.F.** (2003): Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* **2**(4): 664-667.
- Insall, R.H., Borleis, J. & Devreotes, P.N.** The aimless RasGEF is required for processing of chemotactic signals through G-protein-coupled receptors in *Dictyostelium*. *Curr. Biol.* **6**: 719-729.
- Iwase, S., Lan, F., Baykiss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstone, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M., Shi, Y.** (2007): The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* **128**(6): 1077-1088.
- Jennes, I.** (2006): Dissertation: Differentielle Expressionsanalyse Cbfa-regulierter Proteine während des Übergangs vom Wachstum zur Entwicklung in *Dictyostelium discoideum*.
- Johnson K.R., Lehn, D.A., Elton, T.S., Barr, P.J., Reeves, R.** (1988): Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group protein HMG-I(Y). *J. Biol. Chem.* **263**(34): 18338-18342.
- Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, D., Landsberger, N., Strouboulis, J., Wolffe, A.P.** (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylases to repress transcription. *Nat. Genet.* **19**(2): 187-191.
- Josep, J.M., Fey, P., Ramalingam, N., Liu, X.I., Rohlf, M., Noegel, A.A., Müller Taubenberger, A., Glöckner, G., Schleicher, M.** (2008): The actinome of *Dictyostelium discoideum* in comparison to actins and actin-related proteins from other organisms. *PLoS One* **3**(7): e2654.
- Kaller, M.; Euteneuer, U. & Nellen, W.** (2006): Differential effects of heterochromatin protein 1 isoforms on mitotic chromosome distribution and growth in *Dictyostelium discoideum*. *Eukaryot. Cell* **5**(3): 530-543.
- Kaller, M., Földesi, B. & Nellen, W.** (2007): Localization and organization of protein factors involved in chromosome inheritance in *Dictyostelium discoideum*. *Biol. Chem.* **388**(4): 355-365.
- Kessin, R.H.** (2001): *Dictyostelium*: Evolution, cell biology and the development of multicellularity. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Kiyosawa, H., Hughes, J.E., Podgorski, G.J., Welker, D.L.** (1993): Small circular plasmids of the eukaryote *Dictyostelium purpureum* define two novel plasmid families. *Plasmid* **30**: 106-118.
- Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D. & Douglas, M.G.** (1983): A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- Klose, R.J., Yamane, K., Bae, Y., Zhang, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., Zhang, Y.** (2006a): The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature* **442**: 312-316
- Klose, R.J., Kallin, E.M., Zhang, Y.** (2006b): JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **7**(9): 715-727.

- Knetsch, M.L.W., Epskamp, S.J.P., Schenk, P.W., Wang, Y.W., Segall, J.E., Snaar-Jagalska, B.E.** (1996): Dual role of cAMP and involvement of both G-proteins and ras in regulation of ERK2 in *Dictyostelium discoideum*. *EMBO J.* **15**: 3361-3368.
- Kouzarides, T.** (2007): Chromatin modifications and their functions. *Cell* **128**(4): 693-705.
- Krishna S.S., Majumdar, I., Grishin, N.V.** (2003): Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res.* **31**(2): 532-550.
- Kuhlmann, M., Borisova, B.E., Kaller, M., Larsson, P., Stach, D., Na, J., Eichinger, L., Lyko, F., Ambros, V., Söderbom, F., Hammann, C., Nellen, W.** (2005): Silencing of retrotransposons in *Dictyostelium* by DNA methylation and RNAi. *Nuc. Acids Res.* **33**(19):6405-6417.
- Laemmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larsson, P., Hinas, A., Ardell, D.H., Kirsebom, L.A., Virtanen, A., Söderbom, F.** (2008): De novo search for non-coding RNA genes in the AT-rich genome of *Dictyostelium discoideum*: performance of Markov-dependent genome feature scoring. *Genome Res.* **18**(6): 888-899.
- Lee, C., Kim, S.J., Jeong, D.G., Lee, S.M., Ryu, S.E.** (2003): Structure of human FIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J. Biol. Chem.* **278**(9): 7558-7563.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., Ambros, V.** (1993): The *C. elegans* heterochromatic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**(5): 843-854.
- Li, E.** (2002): Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**(9): 662-672.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., Patel, D.J.** (2006): Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* **442**(7098): 91-95.
- Li, F., Huarte, M., Zaratiegui, M., Vaughn, M.W., Shi, Y., Martienssen, R., Cande, W.Z.** (2008): Lid2 is required for coordinating H3K4 and H3K9 methylation of heterochromatin and euchromatin. *Cell* **135**: 272-283.
- Loomis, W.F.** (1993): Lateral inhibition and pattern formation in *Dictyostelium*. *Curr. Topics Dev. Biol.* **28**: 1-46.
- Loomis, W.F.** (1998): Role of PKA in the timing of developmental events in *Dictyostelium* cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(3): 684-694.
- Loomis, W.F.** (2006): The *Dictyostelium* genome. *Curr. Issues Mol. Biol.* **8**: 63-74.
- Lopez-Bigas, N., Kisiel, T.A., Dewaal, D.C., Holmes, K.B., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Murray, H.L., Young, R.A., Benevolenskaya, E.V.** (2008): Genome-wide analysis of the H3K4 histone demethylase RBP2 reveals a transcriptional program controlling differentiation. *Mol. Cell.* **31**(4): 520-530.
- Lucas, J., Bilzer, A., Moll, L., Zündorf, I., Dingermann, T., Eichinger, L., Siol, O., Winckler, T.** (2009): The carboxy-terminal domain of *dictyostelium* C-module-bindingfactor is an independent gene regulatory entity. *PLoS ONE* **4**(4) e5012.
- Lucas, J.** (2009): Dissertation: Struktur und Funktion der Carboxy-terminalen Domäne des Transkriptionsfaktors CbfA aus *Dictyostelium discoideum*.
- Malik, H.S., Burke, W.D., Eickbush, T.H.** (1999): The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. *Mol. Biol. Evol.* **16**(6): 793-805.
- MacPherson, S., Larochelle, M. und Turcotte, B.** (2006): A fungal family of transcriptional regulators: the zinc finger cluster proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(3): 583-604.

- McClintock, B.** (1951): Chromosome organization and genetic expression. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **16**: 13-47.
- Maeda, M., Aubry, L., Insall, R., Gaskins, C., Devreotes, P.N., Firtel, R.A.** (1996): Seven helix chemoattractant receptors transiently stimulate mitogen-activated protein kinase in *Dictyostelium* - role of heterotrimeric G proteins. *J. Biol. Chem.* **271**: 3351-3354.
- Mane, S.P., Evans, C., Cooper, K.L., Crasta, O.R., Folkerts, O., Hutchison, S.K., Harkins, T.T., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Jensen, R.V.** (2009): Transcriptome sequencing of the Microarray Quality Control (MAQC) RNA reference samples using next generation sequencing. *BMC Genomics* **10**: 264.
- Mann, S.K.O., Yonemoto, W.M., Taylor, S.S., Firtel, R.A.** (1992): DdPK3, which plays essential roles during *Dictyostelium* development, encodes the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10701-10705.
- Mann, S.K.O., Brown, J.M., Briscoe, C., Parent, C., Pitt, G., Devreotes, P.N.** (1997): Role of cAMP-dependent protein kinase in controlling aggregation and postaggregative development in *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **183**: 208-221.
- Manfioletti G., Giancotti, V., Bandiera, A., Buratti, E., Sautière, P., Cary, P., Crane-Robinson, C., Coles, B., Goodwin, G.H.** (1991): cDNA cloning of the HMGI-C phosphoprotein, a nuclear protein associated with neoplastic and undifferentiated phenotypes. *Nucleic Acids Res.* **19(24)**: 6793-6797.
- Marschalek, R., Brechner, T., Amon-Böhm, E., Dingermann, T.** (1989): Transfer RNA genes: landmarks for integration of mobile genetic elements in *Dictyostelium discoideum*. *Science* **244(4911)**: 493-496.
- Marschalek, R., Hofmann, J., Schumann, G., Dingermann, T.** (1992a): Two distinct subforms of the retrotransposable DRE element in NC4 strains of *Dictyostelium discoideum*. *Nucleic. Acids Research* **20(23)**: 6247-6252.
- Marschalek, R., Hofmann, J., Schumann, G., Gösseger, R., Dingermann, T.** (1992b): Structure of DER, a retrotransposable element which integrates with position specificity upstream of *Dictyostelium discoideum* tRNA genes. *Mol. Cell Biol.* **12(1)**: 229-239.
- Martens, H., Novotny, J., Oberstrass, J., Steck, T.L., Postlethwait, P., Nellen, W.** (2002): RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell.* **13(2)**: 445-453.
- Martin, C. & Zhang, Y.** (2005): The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6(11)**: 838-849.
- Matzke, M., Kanno, T., Huettel, B., Daxinger, L., Matzke, A.J.** (2007): Targets of RNA-directed DNA methylation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10(5)**: 512-519.
- Meima, M.M., Weening, K.E. & Schaap, P.** (2007): Vectors for expression of proteins with single or combinatorial fluorescent protein and tandem affinity purification tags in *Dictyostelium*. *Protein Expr. Purif.* **53(2)**: 283-288.
- Mellor, J.** (2006): It takes a PHD to read the histone code. *Cell* **126(1)**: 22-24.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Günther, T., Buettner, R., Schüle, R.** (2005): LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* **437(7057)**: 436-439.
- Miller, J., McLachlan, A.D., Klug, A.** (1985): Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4(6)**: 1609-1614.
- Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., Wu, C.** (2004): ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science* **303(5656)**: 324-325.
- Mutzel, R.** (1991): Cellular slime molds: why and how to become pluricellular. *Bull. Inst. Pasteur* **89**: 51-58.

- Na, J., Tunggal, B. & Eichinger, L. (2007): STATc is a key regulator of the transcriptional response to hyperosmotic shock. *BMC Genomics* **8**:123.
- Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., Bird, A. (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* **393**(6683): 386-389.
- Nara, T., Hshimoto, T. & Aoki, T. (2000): Evolutionary implications of the mosaic pyrimidine-biosynthetic pathway in eukaryotes. *Gene* **257**(2): 209-222.
- Ng, S.S., Kavanagh, K.L., McDonough, M.A., Butler, D., Pilka, E.S., Lienard, B.M., Bray, J.E., Savitsky, P., Gileadi, O., von Delft, F., Rose, N.R., Offer, J., Scheinost, J.C., Borowski, T., Sundstrom, M., Schofield, C.J., Oppermann, U. (2007): Crystal structures of histone demethylases JMJD2A reveal basis for substrate specificity. *Nature* **448**(7149): 87-91.
- Obbard, D.J. & Finnegan, D.J. (2008): RNA interference: endogenous siRNAs derived from transportable elements. *Curr. Biol.* **18**(13): R561-563.
- Ogawa, S., Yoshino, R., Angata, K., Iwamoto, M., Pi, M., Kuroe, K., Matsuo, K., Morio, T., Urushihara, H., Yanagisawa, K., Tanaka, Y. (2000): The mitochondrial DNA of *Dictyostelium discoideum*: complete sequence, gene content and genome organization. *Mol. Gen. Genet.* **263**(3): 514-519.
- Olive, L.S. & Stoianovitch, C. (1975): The Mycetozoeans. New York: *Academic Press*.
- Ooi, S.K. & Bestor, T.H. (2008): The colorful history of active DNA demethylation. *Cell* **133**(7): 1145-1148.
- Parent, C.A. & Devreotes, P.N. (1996): Molecular genetics of signal transduction in *Dictyostelium*. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 411-440.
- Pascual J., Martinez-Yamout, M., Dyson, H.J., Wright, P.E. (2000): Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren-syndrome transcription factor. *J. Mol. Biol.* **304**(5): 723-729.
- Pena, P.V., Davrazou, F., Shi, X., Walter, K.L., Verkhusa, W., Gozani, O., Zhao, R., Kutateladze, T.G. (2006): Molecular mechanism of histone H3K4me3 recognition by plant homeodomain of ING2. *Nature* **442**(7098): 100-103.
- Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in realtime RT PCR. *Nuc. Acids Res.* **29**: e45.
- Phizicky E.M. & Fields, S. (1995): Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**(1): 94-123.
- Pollard, T.D. & Beltzner, C.C (2002): Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**(6): 768-774.
- Popova, B., Kuhlmann, M., Hinas, A., Söderbom, F., Nellen, W. (2006): HelF, a putative RNA helicase acts as a nuclear suppressor of RNAi but not antisense mediated gene silencing. *Nuc. Acids Res.* **34**(3): 773-784.
- Ramsahoye B.H., Biniszkiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., Jaenisch, R. (2000): Non-CpG Methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA Methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**(10): 5237-5242.
- Raper, K.B. (1935): *Dictyostelium discoideum*, a new species of slime mold from decaying forest leaves. *J. Agr. Res.* **50**: 135-147.
- Raper, K.B. & Smith N.R. (1939): The growth of *Dictyostelium discoideum* upon pathogenic bacteria. *J. Bacteriol.* **38**(4): 431-445.
- Raper, K.B. (1984): The Dictyostelids. Princeton; NJ.: *Princeton Univ. Press*.

- Rathi, A. & Clarke, M.** (1992): Expression of early developmental genes in *Dictyostelium discoideum* is initiated during exponential growth by an autocrine-dependent mechanism. *Mech. Dev.* **36**(3): 173-182.
- Reeves, R.** (2001): Molecular biology of HMG proteins: hubs of nuclear function. *Gene* **277**(1-2): 63-81.
- Reeves, R. & Beckerbauer, L.** (2001): HMGI/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochem. Biophys. Acta.* **1519**(1-2): 13-29.
- Sambrook, J. & Russell, D.W.** (2001): molecular cloning: a laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SanMiguel, P., Tikhonov, A., Jin, Y.K., Motchoulskaia, N., Zakharov, D., Melake-Berhan, A., Springer, P.S., Edwards, K.J., Lee, M., Avramova, Z., Bennetzen, J.L.** (1996): Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome. *Science* **274**(5288): 765-768.
- Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A.J., Sherriff, J., Bernstein, B.E., Emre, N.C.T., Schreiber, S.L., Mellor, J., Kouzarides, T.** (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* **419**: 407-411.
- Schaap, P., Winckler, T., Nelson, M., Alvarez-Curto, E., Elgie, B., Hagiwara, H., Cavender, J., Milano-Curto, A., Rozen, D.E., Dingermaier, T., Mutzel, R., Baldauf, S. L.** (2006): Molecular phylogeny and evolution of morphology in the social amoebas. *Science* **314**(5799): 661-663.
- Schumann, G., Zündorf, I., Hofmann, J., Marschalek, R., Dingermaier, T.** (1994): Internally located and oppositely oriented polymerase II promoters direct convergent transcription of a LINE-like retroelement, the *Dictyostelium* repetitive element, from *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell. Biol.* **14**(5): 3074-3084.
- Segel, L.A., Goldbeter, A., Devreotes, P.N., Knox, B.E.** (1986): A mechanism for extract sensory adaption based on receptor modification. *J. Theor. Biol.* **120**: 151-179.
- Shammat, I.M., Gonzales, C.M., Welker, D.L.** (1998): *Dictyostelium discoideum* nuclear plasmid Ddp6 is a new member of the Ddp2 plasmid family. *Curr. Genet.* **33**: 77-82.
- Shammat, I.M. & Welker, D.L.** (1999): Mechanism of action of the Rep protein from *Dictyostelium* Ddp2 plasmid family. *Plasmid* **41**: 248-259.
- Shaulsky, G., Fuller, D. & Loomis, W.F.** (1998): A cAMP-phosphodiesterase controls PKA-dependent differentiation. *Development* **125**: 691-699.
- Shen, X., Ranallo, R., Choi, E., Wu, C.** (2003): Involvement of actin-related proteins in ATP-dependent chromatin remodeling. *Mol. Cell.* **12**(1): 147-155.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetsire, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., Shi, Y.** (2004): Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**: 941-953.
- Shi, X., Hong, T., Walter, K.L., Ewalt, M., Michishita, E., Hung, T., Carney, D., Pena, P., Lan, F., Kaadige, M.R., Lacoste, N., Cayrou, C., Davrazou, F., Saha, A., Cairns, B.R., Ayer, D.E., Kutateladze, T.G., Shi, Y., Cote, J., Chua, K.F., Gozani, O.** (2006): ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* **442**(7098): 96-99.
- Sinha, K.M., Yasuda, H., Coombes, M.M., Dent, S.Y., de Crombrughe, B.** (2010): Regulation of the osteoblast-specific transcription factor Osterix by NO66, a Jumonji family histone demethylase. *EMBO J.* **29**(1): 68-79.
- Siol, O., Dingermaier, T. & Winckler, T.** (2006a): The C-module DNA-binding factor mediates expression of the *Dictyostelium discoideum* aggregation-specific adenyl cyclase ACA. *Eukaryot. Cell* **5**(4): 658-664.

- Siol, O., Boutiliss, M., Chung, T., Glöckner, G., Dinger, T., Winckler, T.** (2006b): Role of RNA polymerase III transcription factor in the selection of integration sites by the *Dictyostelium* non-long terminal repeat retrotransposon TRE5-A. *Mol. Cell Biol.* **26**(22): 8242-8251.
- Siol, O.** (2006c): Dissertation: Untersuchungen zum spezifischen Integrationsmechanismus der TRE5-A Retrotransposons in *Dictyostelium discoideum*.
- Slotkin, R.K. & Martienssen, R.** (2007): Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **8**(4): 272-285.
- Sucgang, R., Weijer, C.J., Siegert, F., Franke, J. & Kessin, R.H.** (1997): Null mutations of the *Dictyostelium* cyclic nucleotide phosphodiesterase gene block chemotactic cell movement in developing aggregates. *Dev. Biol.* **192**: 181-192.
- Sucgang, R., Chen, G., Liu, W., Lindsay, R., Lu, J., Muzny, D., Shaulsky, G., Loomis, W.F., Gibbs, R., Kuspa, A.** (2003): Sequence and structure of the extrachromosomal palindrome encoding the ribosomal RNA genes in *Dictyostelium*. *Nucleic. Acids. Res.* **31**: 2361-2368.
- Sussmann, R. & Sussmann, M.** (1967): Cultivation of *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **29**: 53-55.
- Szafranski K.** (2009) Dissertation: "Die Transposons im Genome von *Dictyostelium discoideum*."
- Takeuchi, T., Yamazaki, Y., Katoh-Fukui, Y., Tsuchiya, R., Kondo, S., Motoyama, J., Higashinakagawa, T.** (1995): Gene trap capture of a novel mouse gene, jumonji, required for neural tube formation. *Genes Dev.* **9**(10): 1211-1222.
- Takeuchi, T.** (1997): Jumonji gene maps to mouse chromosome 13. *Genomics* **45**(1): 240-242.
- Terpe, K.** (2003): Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**(5): 523-533.
- Trewick, S.C., Henshaw, T.F., Hausinger, R.P., Lindahl, T., Sedgwick, B.** (2002): Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. *Nature* **419**(6903): 174-178.
- Trewick, S.C., McLaughlin, P.J., Allshire, R.C.** (2005): Methylation: lost in hydroxylation. *EMBO Rep.* **6**(4): 315-320.
- Tronnorsjö, S., Hanefalk, C., Balciunas, D., Hu, G.Z., Nordberg, N., Murén, E., Ronne, H.** (2007): The jmjN and jmjC domains of the yeast zinc finger Gis1 interact with 19 proteins involved in transcription, sumoylation and DNA repair. *Mol. Genet. Genomics.* **277**(1): 57-70.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., Zhang, Y.** (2006): Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**(7078): 811-816.
- Ubeidat, M. & Rutherford, C.L.** (2002): Expression and one-step purification of a developmentally regulated protein from *Dictyostelium discoideum*. *Protein Expr. Purif.* **25**(3): 472-480.
- Van Haastert, P.J.; Bishop, J.D. & Gomer, R.H.** (1996): The cell density factor CMF regulates the chemoattractant receptor cAR1 in *Dictyostelium*. *J. Cell. Biol.* **134**(6): 1543-1549.
- Wall, P.K., Leebens-Mack, J., Chanderbali, A.S., Barakat, A., Wolcott, E., Liang, H., Landherr, L., Tomsho, L.P., Hu, Y., Carlson, J.E., Ma, H., Schuster, S.C., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Altman, N., dePamphilis, C. W.** (2009): Comparison of next generation sequencing technologies for transcriptome characterization. *BMC Genomics* **10**: 347.
- Watts, D.J. & Ashworth, J.M.** (1970): Growth of myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum* in axenic culture. *Biochem. J.* **119**: 171-174.

- Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S.L., Lawler, J.F., Ostertag, E.M., Kazazian, H.H., Boeke, J.D., Moran, J.V. (2001): Human L1 retrotransposition: cis preference versus trans complementation. *Mol. Cell Biol.* **21**(4): 1429-1439.
- Whetstine, J.R., Nottke, A., Lan, F., Huarte, M., Smolikov, S., Chen, Z., Spooner, E., Li, E., Zhang, G., Colaiacovo, M., Shi, Y. (2006): Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell* **125**(3): 467-481
- Winckler, T., Trautwein, C., Tschepke, C., Neuhäuser, C., Zündorf, I., Beck, P., Dingermann, T. (2001): Gene function analysis by amber stop codon suppression: CMBF is a nuclear protein that supports growth and development of *Dictyostelium* amoebae. *J. Mol. Biol.* **305**: 703-714.
- Winckler, T., Dingermann, T. & Glöckner, G. (2002): *Dictyostelium* mobile elements: strategies to amplify in a compact genome. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**: 2097-2111.
- Winckler, T., Iranfar, N., Beck, P., Jennes, I., Siol, O., Baik, U., Loomis, W.F., Dingermann, T. (2004): CbfA, the C-module DNA-binding factor, plays an essential role in the initiation of *Dictyostelium discoideum* development. *Eukaryot. Cell* **3**(5): 1349-1358.
- Winckler, T., Szafranski, K., Glöckner, G. (2005): Transfer RNA gene-targeted integration: an adaptation of retrotransposable elements to survive in the compact *Dictyostelium discoideum* genome. *Cytogenet. Genome Res.* **110**(1-4): 288-298.
- Wysocka, J. (2006): Identifying novel proteins recognizing histone modifications using peptid pull-down assay. *Methods* **40**(4): 339-343.
- Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Ye, X., Peng, Z., Ma, Y., Yu, Y., Lin, H., Chen, A.P., Chen, C.D. (2007): JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *PNAS* **104**(49): 19226-19231.
- Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., Zhang, Y. (2006): JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* **125**(3): 483-495.
- Zaratiegui, M., Irvine, D.V., Martienssen, R.A. (2007): Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell* **128**(4): 763-776.

Anhang

A Listen der verwendeten Oligonukleotide

Oligonukleotide für Genamplifikationen, Klonierungen und Mutagenesen

Name	Sequenz: 5' → 3'
CMBF131	GGCGGCCGCGGAGCTCGAAGAATTAATAAAGGCACCAAATTC
CMBF132	AGCGGCCGCGGAGCTCTTAATCTTGAATACGGTCGCCATTAAAG
CMBF148 JmjC mut Xa	CCTTTATTAATTCTTCGAGCTCTCGGCCCTCAATGCCGAGATTGG AGCTCGAATTCGGATCCC
CMBF150	CGTTGTAAACGTCACCTCCCTTGTC
CMBF157	GGCCATGGCACCAAATTCGAATTCATAATAATG
CMBF158	GGCTCGAGATCTTGAATACGGTCGCCATTAAAG
CMBF167	GGCCATGGATTTTATATCATATTTACAAGTTTCACCAG
CMBF187	CAAAATCTTCAAATCATCCACTCGAGTTAAATAATAATCAACAAC TTGG
CMBF188	GTCGCTTATCATGTACTCGAGTATTCCTCTCAAAAGAAG
CMBF189	CCTTTCAAATACTTTAATCTCGAGCGTATTCAAGATCGTCGTTG
Actin11-01	GCGGCCGCGAGAATTCGGTTTAGATTTAGCTGGTCGTG
Actin11-02	GCGGCCGCGGATCCTTAGTAACCACGTTCAAGTTAAGATTTTC
Actin11-03	GATTTATACGGTAACGTCGTCTAATCCGGTGATACAACATATGTT CC
Actin11-04	GGAACATAGTTGTATCACCGGATTAGACGACGTTACCGTATAAA TC
Actin11-05	CAACTCCATCATGAAATGTTAAGTTGATATCCGTAAAGATTTATA C
Actin11-06	GTATAAATCTTTACGGATATCAACTTAACATTTTCATGATGGAGTT G
Actin11-07	CCATCATTTCTTAGGTATGTAATCAGCTGGTATCCACGAAACC
Actin11-08	GGTTTCGTGGATACCAGCTGATTACATACCTAAGAATGATGG
Actin11-09	GCGGCCGCGAGAATTCCTCCGGTGATACAACATATGTTTC
Actin11-10	GCGGCCGCGGATCCTTAGGCAATGATTTTAATTTTCATGG
Actin11-11	GCGGCCGCGAGAATTCAAATGTGATGTTGATATCCGTAAAG
Actin12-01	GGCGGCCGCGAGAATTCGGTGATGAAGCTCAATCAAAAAGAG
Actin12-02	GGCGGCCGCGGATCCTTATAAATCTAAACGTAAGATGGCATG
Q-acaA-05	AAGATCTTCTTTAACTCGTGTTTGTGCAAC
Q-acaA-06	GGTTCATCATATTTCTTGAAACCTGCAATTTG
Q-csaA-05	GAAAGCTGGTATCTCAAATGTTGTCAC
Q-csaA-06	GGAATCTGGAGCACAACTATATCAGTAG
Q-DDB0214941-03 (orfSGP)	GTCTGAAGAAATTGAATTTAAATTTGGAG
Q-DDB0214941-04 (orfSGP)	GACGATCAATGGCAAAATTTGGTATTAG

Für die quantitative Echt-Zeit PCR verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz: 5' → 3'
TRE5-A.1	Rep110: CGAAAGAATTATATCTTCCGAATGG Rep181: GAGACAAAGACCCTATCGATGG
TRE5-B	TRE5-B.2: GGTATGAAGTGTTCGGGGATG TRE5-B-05: CATTCTCATCAAATCTGATAGG
TRE5-C	TRE5-C.2: GGTTTGATGGTAGTGCTACTGTGTG TRE5-C-03: CTACATTCAAGAAAAATCTGGAGG
TRE3-A	TRE3-A.2: GGGAGAGATGATTCTGGAATAC CT22: GCAGATTACGCCAACCAC
TRE3-B	TRE3-B.2: GAATTGGTTCATTAGTGTTTATGCTCC TRE3-B-03: CTAGTCAGAACACATGCATATTGG
TRE3-C	TRE3-C.2: GCTGCTGGGGTTTGCCAGG TRE3-C-03: CATTTCATCAAAATCCACAGATGG
TRE3-D	TRE3-D.2: GGAGTGTTCCGGGTTATGCC TRE3-D-03: GGCATAATTATACATCAACTATGG
DGLT-A	DGLTA-02A: ATTACATATCCCCCCTTTTAGTTG DGLTA-22: CAAAGAATAATCTCGATAAAGCTC
Skipper	Q-skipper-01: TGAAGCTAAAACCATTGACGC Q-skipper-02: CTAATTGAACCTCAGCAGTACC
DIRS-1	MD83: GGAAGAAGAAAGCCCCATTC MD84: CAGAGAAGCCATAGCGGAAC
<i>gpdA</i>	Q-GAPDH-01: GGTTGTCCCAATTGGTATTAATGG Q-GAPDH-02: CCGTGGGTTGAATCATATTGAAC
<i>catA</i>	DDB_G0274595-01: GTTTCGCTGCTCGTCAACCATAACAATC DDB_G0274595-02: GCACGAACTTGAATTCTTTGATGGTG

Oligonukleotide für Amplifikationen von Promotorsequenzen aus Chromatin-Immuno-präzipitationen

Name	Sequenz: 5' → 3'
<i>acaA</i> -Promotor	acaAPChIP01: GATATTTGGTTAGGTTAAAATTTGAAACTG acaAPChIP02: GTAGATAATTGAAGCGTACAATAAATAATC
5'-Ende von <i>acaA</i>	Q-acaA05: CAAGATCTTCTTTAACTCGTGTTTGTGCAAC Q-acaA08: GAAACCGCCATATAAGTGTTACCAATGG
DDB_G0277473 (I)	Q-DDB0169268-03: GTAAAATCATCATATTCAAATTCACCAC Q-DDB0169268-04: CAATTACCTCATTTTCCAATATAGCCAAC
DDB_G0281609 (II)	DDB0204558-ChIP03: GATCCAAATTCAGATAGTGCGAAGT G DDB0204558-ChIP04: GAGCAACTAATTTTCTGCCAGTGGC
DDB_G0282815 (III)	Q-DDB0214941-03: GTCTGAAGAAATTGAATTTAAATTG GAG Q-DDB0214941-04: GACGATCAATGGCAAAATTTGGTATTAG
DDB_G0292986 (IV)	Q-DDB0214895-03: GTCTGATGATTATGAACTAAAGGAA TTG Q-DDB0214895-04: CAACATTCATTTTCAGGGTCTTGATTTG

Name	Sequenz: 5' → 3'
DDB_G0277901 (V)	Q-DDB0214930-01: GAGGATTAATGAATAGATCAATTTGTG Q-DDB0214930-02: TGAACCAAAATATTCAACAAATGTATC
DDB_G0270836 (VI)	DDB0216231ChIP01:GGCAAATTTATTCTCAGGTATAGCA TTGG DDB0216231ChIP02:CATCATCGTTTGAATAGTTGTGATC CTTTG
<i>gpdA</i>	Q-GAPDH-01: GGTTGTCCCAATTGGTATTAATGG Q-GAPDH-02: CCGTGGGTGAATCATATTTGAAC

B Plasmidliste

In dieser Liste sind alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Vektoren aufgeführt. Die Plasmidnummer ist eine interne Nummer der Plasmiddatenbank des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie.

Plasmid Name	Nummer	Insert
pGEMJmjC(131/132)	2.0035	PCR: CMBF131 und 132 an pPB4c; als <i>NotI</i> -Fragment in pGEM-T
pGBKT7JmjC(131/132)	2.0041	<i>NotI</i> -Fragment aus pGEMJmjC(131/132) (2.0035)
pET33b(+)JmjC(131/132)	2.0059	<i>NotI</i> -Fragment aus pGEM-JmjC(131/132) (2.0035); Expressionskonstrukt: (His) ₆ -Cbfa ²⁻³⁷⁰
pMALc2x(NotI)JmjC(131/132)	2.0060	<i>NotI</i> -Fragment aus pGBKT7JmjC (131/132) (2.0041); Expressionskonstrukt: MBP-Cbfa ²⁻³⁷⁰
pGADT7JmjC(131/132)	2.0076	<i>SacI</i> -Fragment aus pGEMJmjC(131/132) (2.0035)
pGEM7zfmjC(131/132)#8 Mut Xa	2.0175	<i>SphI</i> / <i>XhoI</i> -Fragment aus pET33b(+)JmjC (131/132) (2.0059) in pGEM7zf; an #8 dann Einzelstrang-Mutagenese mit CMBF148JmjC mut Xa
pGEM7zfmjC(131/132)Mut Xa Mut	2.0205	Einzelstrang-Mutagenese an pGEM7zfmjC (131/132)#8 Mut Xa (2.0175) mit CMBF150
pET33b(+)JmjC(131/132)Xa	2.0206	als <i>SphI</i> / <i>XhoI</i> -Fragment aus pGEM7zfmjC (131/132) Mut Xa Mut (2.0205) in pET33b(+) ligiert
pET33b(+)JmjC(157/158)	2.0247	PCR: CMBF157 und 158 an pET33b(+)JmjC (131/132) (2.0206); als <i>NcoI</i> / <i>XhoI</i> -Fragment in pET33b(+) ligiert; Expressionskonstrukt: Cbfa ⁷⁻³⁷⁰ -(His) ₆
pGADT7-REC-M2R8	2.0261	Plasmid-Rescue #8 aus Hefe vom Mating2 (JmjC131/132 gegen Bank2)
pGADT7-REC-M2R79	2.0262	Plasmid-Rescue #79 aus Hefe vom Mating2 (JmjC131-132 gegen Bank2)
pGADT7-Act11(181-197)	2.0275	PCR mit Act11-01 und 02 aus pGADT7-REC-M2R8(2.0061); als <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment in pGADT7 ligiert
pGADT7-Act11(252-270)	2.0277	Doppelstrang-Mutagenese mit Act11-07 und 08 an pGADT7-REC-M2R79 (2.0262)
pGADT7-Act11(252-286)	2.0278	Doppelstrang-Mutagenese mit Act11-05 und 06 an pGADT7-REC-M2R79 (2.0262)
pGADT7-Act11(252-298)	2.0279	Doppelstrang-Mutagenese mit Act11-03 und 04 an pGADT7-REC-M2R79 (2.0262)

Plasmid Name	Nummer	Insert
pGEMJmjC(158/167)	2.0280	PCR mit CMBF158 und 167 an pET33b(+)JmjC(131-132)Xa (2.0206)
pET33b(+)JmjC(158/167)	2.0281	PCR mit CMBF158 und 167 an pET33b(+)JmjC(131-132)Xa (2.0206); als <i>NcoI/XhoI</i> -Fragment in pET33b(+) ligiert; Expressionskonstrukt: CbfA ⁸⁶⁻³⁷⁰ -(His) ₆
pGADT7-REC-M2R39	2.0284	Plasmid-Rescue #38 aus Hefe vom Mating2 (JmjC131/132 gegen Bank2)
pGADT7-Act11(285-332)	2.0287	PCR: Act11-10 und 11 an pGADT7-REC-M2R79 (2.0262); als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pGADT7 ligiert
pGADT7-Act11(301-332)	2.0288	PCR: Act11-09 und 10 an pGADT7-REC-M2R79 (2.0262); als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pGADT7 ligiert
pGADT7-Act12(56-181)	2.0303	PCR: Act12-01 und 02 an pGADT7-REC-M2R38 (2.0284); als <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment in pGADT7 ligiert
pDdNTAP-NYFP-M2R40	2.0308	als <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment aus pGADT7-M2R40 in pDdNTAP-NYFP (2.0118) ligiert
pTYCbfA-Ex_XhoΔ482-562	2.0360	über zwei Einzelstrang-Mutagenese zwei <i>XhoI</i> -Schnittstellen eingeführt, Sequenz ausgeschnitten und ligiert
pTYCbfA-Ex_XhoΔ365-562	2.0361	über zwei Einzelstrang-Mutagenese zwei <i>XhoI</i> -Schnittstellen eingeführt, Sequenz ausgeschnitten und ligiert
pGADT7-REC-M2R40	2.0394	Plasmid-Rescue #40 aus Hefe vom Mating2 (JmjC131/132 gegen Bank2)

C Regulationen der differenziell exprimierten Retrotransposons zwischen AX2 und JH.D, JHD[rCbfA] und JH.D sowie zwischen GFP-CTD und JH.D

In den nachfolgenden Tabellen sind die berechneten CbfA-abhängigen Regulationen verschiedener Retrotransposons von *Dictyostelium discoideum* aus AX2 in Bezug zu JH.D, aus JH.D[rCbfA] in Bezug zu JH.D und aus JH.D[GFP-CTD] in Bezug zu JH.D dargestellt. MW = Mittelwert; \pm SD = Standardabweichung.

AX2/JH.D	Replik a	Replik b	Replik c	MW	\pm SD
TRE5-A.1	7,21	4,06	3,73	5,00	1,92
TRE5-B	4,03	2,71	2,87	3,20	0,72
TRE3-A	1,06	0,55	0,78	0,80	0,26
TRE3-C	0,28	0,14	0,18	0,20	0,07
Skipper	2,93	3,39	3,20	3,17	0,23
DGLT-A	1,10	0,83	0,68	0,87	0,21
DIRS-1	0,93	1,04	0,87	0,95	0,09

JH.D[rCbfa]/JH.D	Replikat a	Replikat b	Replikat c	MW	±SD
TRE5-A.1	7,73	7,62	5,82	7,05	1,07
TRE5-B	0,92	1,07	0,85	0,95	0,11
TRE3-A	0,72	1,62	1,72	1,35	0,55
TRE3-C	0,48	0,92	0,99	0,80	0,28
skipper	1,85	2,43	2,48	2,25	0,35
DGLT-A	0,91	2,19	1,35	1,48	0,65
DIRS	0,49	0,82	0,89	0,73	0,22

JH.D[GFP-CTD]/JH.D	Replikat a	Replikat b	Replikat c	MW	±SD
TRE5-A.1	6,23	15,14	8,57	9,98	4,62
TRE5-B	0,61	1,28	0,95	0,95	0,34
TRE3-A	0,81	1,17	1,33	1,10	0,26
TRE3-C	1,45	0,57	1,96	1,33	0,70
skipper	0,60	0,83	0,75	0,73	0,12
DGLT-A	0,48	1,20	1,03	0,90	0,38
DIRS-1	0,56	1,26	0,65	0,82	0,38

D Regulationen von TRE5-A.1, DIRS-1 und Skipper zwischen AX2 und *Knock-out*-Stämmen von RNAi-Proteine codierenden Genen

Nachfolgend wurden die Regulationen aufgeführt, die für die Retrotransposons TRE5-A.1, DIRS-1 und Skipper von AX2 in Bezug zu verschiedenen *Knock-out*-Stämmen berechnet wurden. MW = Mittelwert; ±SD = Standardabweichung.

TRE5-A.1 (AX2/ <i>Knock-out</i>)	Replikat a	Replikat b	Replikat c	MW	±SD
<i>rrpA-</i>	0,52	0,44	0,59	0,52	0,08
<i>rrpB-</i>	0,91	1,12	1,01	1,01	0,11
<i>rrpC-</i>	0,46	0,53	0,61	0,53	0,08
<i>helF-</i>	1,1	1,22	1,12	1,15	0,06
<i>dnmA-</i>	1,64	1,52	1,47	1,54	0,09
<i>set1-</i>	1,61	1,22	1,59	1,47	0,22

DIRS-1 (AX2/ <i>Knock-out</i>)	Replikat a	Replikat b	Replikat c	MW	±SD
<i>rrpA-</i>	0,96	0,99	1,41	1,09	0,25
<i>rrpB-</i>	1,27	0,86	1,05	1,06	0,21
<i>rrpC-</i>	0,31	0,26	0,27	0,28	0,03
<i>helF-</i>	0,25	0,21	0,29	0,25	0,04
<i>dnmA-</i>	1,14	0,87	1,41	1,14	0,27
<i>set1-</i>	4,35	3,57	4	3,97	0,39

Skipper (AX2/ <i>Knock-out</i>)	Replikat a	Replikat b	Replikat c	MW	±SD
<i>rrpA-</i>	0,06	0,12	0,10	0,09	0,03
<i>rrpB-</i>	1,58	2,77	1,92	2,09	0,61
<i>rrpC-</i>	0,16	0,21	0,17	0,18	0,03
<i>helF-</i>	2,07	1,57	1,54	1,73	0,30
<i>dnmA-</i>	0,08	0,15	0,07	0,10	0,04
<i>set1-</i>	0,85	0,81	0,83	0,83	0,02

Liste der wissenschaftlichen Publikationen

Bilzer, A.; Dölz, H.; Reinhardt, A.; Schmith, A.; Siol, S.; Winckler, T. (2010)

The C-module-binding factor supports the amplification of TRE5-A retrotransposons in the *Dictyostelium discoideum* genome. *Eukaryotic Cell* (in press)

Dölz, H.; Lucas, J. & Winckler, T. (2007)

Function of jumonji-type chromatin regulator CbfA in *Dictyostelium*. Posterpräsentation 2nd meeting of the Joint Research Center SFB 604: signaling complexes 2007, Jena (Deutschland)

Lucas, J.; Dölz, H.; Bilzer, A.; Siol, O.; Winckler, T. (2007)

Two-hybrid screening for binding partners of C-module-binding factor CbfA. Posterpräsentation Annual International *Dictyostelium* Conference 2007; Rotenburg an der Fulda (Deutschland)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie des Instituts für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Thomas Winckler möchte ich für die Überlassung dieses sehr interessanten Dissertationsthemas danken. Durch seine Diskussionsbereitschaft und sein fachliches Wissen half er mir besonders in schwierigen Situationen weiter.

Für die Finanzierung der vorliegenden Arbeit bedanke ich mich bei dem Sonderforschungsbereich 604, wodurch mir auch die Möglichkeit gegeben wurde, Kontakte zu weiteren Arbeitsgruppen zu knüpfen. Ohne diese Zusammenarbeit wären einige Experimente nicht möglich gewesen. Daher richtet sich mein besonderer Dank an Herrn Prof. Dr. Thorsten Heinzel vom Lehrstuhl für Biochemie der Universität Jena und Herrn Dr. Frank Hänel aus der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des Leibniz-Instituts für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie – Hans-Knöll-Institut, Jena.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Nellen von der Abteilung für Genetik der Universität Kassel möchte ich mich für die Möglichkeit, in seiner Abteilung mein Methodenspektrum zu erweitern, herzlich bedanken. In diesem Zusammenhang gilt ebenso mein Dank Herrn Manu Dubin für die geduldige Beantwortung meiner Fragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Constanze Than-Breithaupt aus der Abteilung Physikalische Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Ihr fachliches Wissen im Bereich der Proteinbiochemie und ihre persönliche Unterstützung waren mir eine große Hilfe.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Grosse und Herrn Dr. Bernhard Schlott vom Leibniz-Institut für Altersforschung – Fritz-Lipmann-Institut e. V., Jena, bedanke ich mich für die Amino-terminale Sequenzierung der Proteinfragmente. Für die freundliche Aufnahme im Labor und die Einweisung in radioaktive Arbeitsmethoden bedanke ich mich bei Frau Nicole Borth und Frau Claudia Franke vom Hans-Knöll-Institut, Jena.

Ein besonderer Dank geht an die Mitarbeiter des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie für das freundliche Arbeitsklima und an meine Freunde, die mich stets ermutigten und für die erforderliche Abwechslung sorgten.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir in allen Lebenslagen eine große Hilfe war. Ich widme ihnen diese Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Heike Dölz
Geburtsdatum	06.07.1980
Geburtsort	Gardelegen
Wohnort	Leipziger Str. 6, 07743 Jena

Schulische Ausbildung

09/1987 – 08/1991	Grundschule „Karl Marx“, Gardelegen
09/1991 – 07/1999	Gymnasium „Geschwister Scholl“, Gardelegen
10.07.1999	Allgemeine Hochschulreife, Abitur

Studium

10/1999 – 12/2005	Studium der Biologie (Diplom) an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Schwerpunktfächer: Hauptfach in Spezieller Zoologie Nebenfach in Genetik Nebenfach in Humananatomie Diplomarbeit: „Inzucht und genetische Variabilität der Hunderasse Deutsch-Stichelhaar – Eine molekulargenetische Analyse mittels DNA-Mikrosatelliten-Marker“
02/2006 – 12/2009	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazie, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena Promotion zum Thema: „Funktion von CbfA in der epigenetischen Kontrolle des TRE5-A-Retrotransposons aus <i>Dictyostelium discoideum</i> “
01/2010 – 11/2010	Anfertigung der Dissertationsschrift

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Heike Dölz, geboren am 06.07.1980 in Gardelegen,

- dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, Quellen und persönlichen Mitteilungen angefertigt habe,
- dass ich die vorliegende Arbeit, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung noch an keiner anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit für die staatliche oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- dass ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,
- dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Jena, 02.12.2010

Heike Dölz